

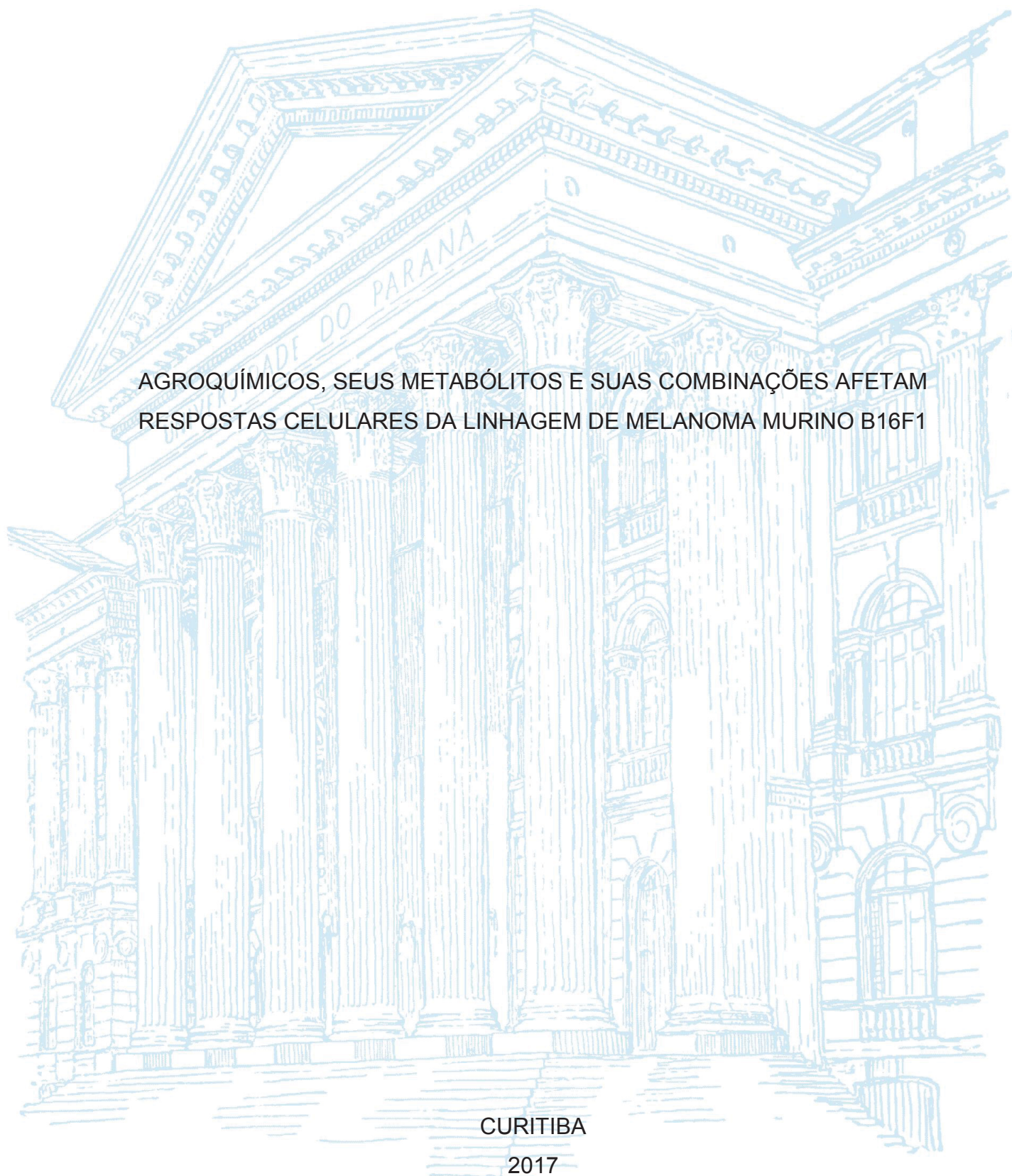
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

YVANNA CARLA DE SOUZA SALGADO

AGROQUÍMICOS, SEUS METABÓLITOS E SUAS COMBINAÇÕES AFETAM  
RESPOSTAS CELULARES DA LINHAGEM DE MELANOMA MURINO B16F1

CURITIBA

2017



YVANNA CARLA DE SOUZA SALGADO

AGROQUÍMICOS, SEUS METABÓLITOS E SUAS COMBINAÇÕES AFETAM  
RESPOSTAS CELULARES DA LINHAGEM DE MELANOMA MURINO B16F1

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e Molecular, no Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ciro A. Oliveira Ribeiro  
Co-Orientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas  
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Salgado, Yvanna Carla de Souza

Agroquímicos, seus metabólitos e suas combinações afetam respostas celulares da linhagem de melanoma murino B16F1. / Yvanna Carla de Souza Salgado. – Curitiba, 2017.

90p. : il. ; 30cm.

Orientador: Ciro A. Oliveira Ribeiro

Co-orientador: Francisco Filipak Neto

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Câncer. 2. Agroquímicos. I. Título II. Ribeiro, Ciro A. Oliveira. III. Filipak Neto, Francisco. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 616.994



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **YVANNA CARLA DE SOUZA SALGADO** intitulada: **AGROQUÍMICOS, SEUS METABÓLITOS E SUAS COMBINAÇÕES AFETAM RESPOSTAS CELULARES DA LINHAGEM DE MELANOMA MURINO B16F1**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 29 de Setembro de 2017.

CIRO ALBERTO DE OLIVEIRA RIBEIRO  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MARIA CRISTINA LEME GODOY DOS SANTOS  
Avaliador Interno (UFPR)

KÁTIA SABRINA PALUDO  
Avaliador Externo (UFPR)

MARIA ELIANE MERLIN ROCHA  
Avaliador Externo (UFPR)

DANIEL BUSSOLARO  
Avaliador Externo (UFPR)



## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ciro A. O. Ribeiro eterna gratidão por me receber solícitamente em seu laboratório e me dar a oportunidade de desenvolver esse trabalho; em especial pelos seus conhecimentos técnicos, pela dedicação, paciência, disposição em ajudar e solucionar problemas, e pela a confiança a mim dedicada.

Ao Prof. Dr. Francisco Filipak Neto pela confiança, pelo conhecimento técnico e pela prontidão em ajudar sempre; por estimular o conhecimento científico e estar sempre disposto a inovar. A ambos os professores minha admiração pela inteligência emocional e habilidade em conduzir toda a equipe Labtox.

Ao Prof. Dr. Marco A. F. Randi pelo ombro amigo e por abrir as portas para o ingresso ao laboratório. À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Célia R. C. Franco pelo acompanhamento em todo desenvolvimento do trabalho e suas contribuições. Ao Prof. Dr. Silvio por abrir as portas do seu laboratório para a finalização do trabalho. À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcia H. Appel pelo acompanhamento do trabalho, auxílio, contribuições e pelo ombro amigo.

À minha mãe Isabel de Souza, minha fortaleza; pelo amor, dedicação e apoio em todos os projetos que inicio; e, *in memoriam* dos meus amados avós Anna e Dante que transmitiram seus valores e me dedicaram seu amor.

À minha amiga Tatiana S. Ital e à sua família, pela oportunidade de exercer a docência e pelo carinho e valiosa amizade. Aos amigos próximos pelo carinho e compreensão nos momentos de ausência.

Às amigas e parceiras de pesquisa, Jessica e Marianna, que me ajudaram neste trabalho e me apoiaram em todas as etapas; e com as quais eu pude sempre contar com o apoio, respeito e carinho.

Aos colegas de laboratório por dividirem seu conhecimento, em especial às amigas: Ana Carolina, Renata, Halina, Flávia, Débora, Manuela e Maristela por dividirem as inseguranças, pelo apoio dentro e fora do laboratório e pelas risadas para aliviar as tensões.

As alunas Mayla e Fernanda que auxiliaram na microscopia eletrônica. Aos funcionários da UFPR, técnicos e administrativos, em especial ao Sr. Luiz, Sr. Nino, Rodrigo, Fábio e Israel.

A todos que de uma maneira ou de outra tornaram esta etapa possível, apoiando e acreditando nesta conquista.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

(Albert Einstein)

## RESUMO

A extensa utilização de agroquímicos aumenta a liberação de xenobióticos no meio ambiente; que podem ser potencialmente capazes de atuar como indutores ou promotores do processo tumoral. Adicionalmente, suas misturas presentes no ambiente, podem interagir direta ou indiretamente por diferentes mecanismos, e os efeitos tóxicos da associação podem diferir do efeito esperado da substância isolada. Os estudos epidemiológicos são controversos nos achados que identificam a relação entre a exposição a agroquímicos e o aumento do risco de câncer; e, estudos que investigam a atuação de poluentes no prognóstico do câncer não estão disponíveis até o presente momento. O objetivo deste trabalho é verificar a resposta celular e o mecanismo de quimiorresistência por transportadores de efluxo de drogas, frente à exposição aos agroquímicos de importância comercial e ambiental e seus metabólitos isolados ou associados, nas linhagens de melanoma murino B16F1. A exposição aos agroquímicos e misturas pode alterar de forma diferente a viabilidade e o metabolismo das células B16F1; afetando negativamente a proliferação, o número de colônias e a capacidade de resistência a múltiplos fármacos das células B16F1 mesmo em concentrações abaixo da ingestão diária aceitável, disponíveis pela agência reguladora nacional. Estas respostas significativas e distintas são muito importantes, uma vez que as linhagens de melanoma geralmente possuem responsividade reduzida. As células expostas ao 2,4,6-tribromofenol (2,4,6-TBF) aumentaram o metabolismo e os níveis de mRNA de ABCB5 (qPCR), mas demonstraram uma redução da proliferação, migração e atividade de transportadores de efluxo de drogas, demonstrando que as concentrações testadas apresentam baixa toxicidade para as células de melanoma B16F1; no entanto, o duplo efeito no perfil metastático e de quimiorresistência sugerem que o aumento do ABCB5 modula positivamente a quimiorresistência celular, mas diminui a migração celular e a proliferação. Há uma forte indicação de que os agroquímicos podem interferir com o mecanismo de quimiorresistência, responsável pelo fracasso terapêutico relacionado à alta morbidade e mortalidade do melanoma cutâneo.

**Palavras-chave:** Agroquímicos, Tribromofenol, B16F1, Cancer, Misturas.

## ABSTRACT

The extensive use of agrochemicals increases the release of xenobiotics in the environment; which may be potentially capable of acting as inducers or promoters of the tumor process. Additionally, their mixtures, present in the environment, may interact directly or indirectly through different mechanisms, and the toxic effects of the association may differ from the expected effect of the isolated substance. Epidemiological studies are controversial in the findings that identify the relationship between exposure to agrochemicals and increased risk of cancer; and, studies investigating the performance of pollutants in the prognosis of cancer are not available until the present moment. The objective of this work is to verify the cellular response and mechanism of chemoresistance by drug efflux transporters, by exposure to agrochemicals of commercial and environmental importance and their metabolites isolated or associated, in the murine melanoma B16F1 lineage. Exposure to agrochemicals and mixtures may alter the viability and metabolism of B16F1 cells differently; negatively affecting the proliferation, number of colonies and multi-drug resistance capacity of B16F1 cells even at concentrations below the acceptable daily intake available by the national regulatory agency. These significant and distinct responses are very important, since melanoma lineages generally have reduced responsiveness. Cells exposed to 2,4,6-tribromophenol (2,4,6-TBF) increased metabolism and levels of ABCB5 mRNA (qPCR), but demonstrated a reduction in proliferation, migration, and activity of drug efflux transporters, demonstrating that the concentrations tested showed low toxicity to the B16F1 melanoma cells; however, the double effect on the metastatic profile and chemoresistance suggest that increased ABCB5 positively modulates cell chemoresistance but decreases cell migration and proliferation. There is a strong indication that agrochemicals may interfere with the mechanism of chemoresistance, responsible for therapeutic failure related to high morbidity and mortality of cutaneous melanoma.

**Key-words:** Agrochemicals, Tribromophenol, B16F1, Cancer, Mixtures.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.1	JUSTIFICATIVA.....	17
1.2	OBJETIVOS .....	21
1.2.1	Objetivo geral .....	21
1.2.2	Objetivos específicos.....	21
1.3	DESENHO EXPERIMENTAL .....	22
1.3.1	Divisão dos Capítulos .....	22
1.3.2	Padronização das Concentrações .....	22
1.3.3	Padronização da Linhagem Celular.....	24
1.3.4	Padronização dos Tempos de Exposição.....	24
<b>1.3.5</b>	<b>FINANCIAMENTO DA PESQUISA.....</b>	<b>24</b>
	<b>CAPÍTULO I: Tribromophenol affects the metabolism, proliferation, migration and multidrug resistance transporters activity of murine melanoma cells B16F1 .....</b>	<b>26</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>METHODS.....</b>	<b>29</b>
2.1	EXPERIMENTAL DESIGN .....	29
2.2	CYTOTOXICITY ASSAYS.....	29
2.3	REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) LEVELS AND DRUG-EFFLUX TRANSPORTERS ACTIVITY .....	29
2.3.1	ROS.....	30
2.3.2	Drug-efflux transporters .....	30
2.4	CELL CYCLE AND DEATH ASSAYS.....	30
2.5	SCRATCH AND CLONOGENIC ASSAYS .....	30
2.5.1	Scratch assay .....	30
2.5.2	Clonogenic assay .....	31
2.6	qPCR.....	31
2.7	STATISTICAL PROCEDURES.....	32
<b>3</b>	<b>RESULTS .....</b>	<b>32</b>
3.1	PROCEDURES TO SELECT THE TBP TEST CONCENTRATIONS .....	32
3.2	CELL RESPONSES TO TBP .....	32

3.3	MULTIDRUG RESISTANCE ACTIVITY .....	33
4	<b>DISCUSSION</b> .....	39
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42
	<b>CAPÍTULO II: Isolated agrochemicals, metabolites and mixtures affect the phenotype of murine melanoma B16F1 cells</b> .....	48
1	<b>INTRODUCTION</b> .....	50
2	<b>METHODS</b> .....	51
2.1	EXPERIMENTAL DESIGN .....	51
2.2	CYTOTOXICITY OF ISOLATED AGROCHEMICALS .....	53
2.3	CYTOTOXICITY OF ISOLATED AGROCHEMICALS AND THE MIXTURES .....	53
2.4	MULTIDRUG RESISTANCE .....	53
2.4.1	Activity .....	53
2.4.2	qPCR for ABCB5 .....	54
2.5	CELL RESPONSES .....	54
2.5.1	Reactive oxygen species (ROS).....	54
2.5.2	P53 .....	54
2.5.3	Cell cycle and death assays .....	55
2.5.4	Scratch and clonogenic assays .....	55
2.5.5	Ultrastructure procedures .....	56
2.6	STATISTICAL PROCEDURES.....	56
3	<b>RESULTS</b> .....	57
3.1	CYTOTOXICITY OF ISOLATED AGROCHEMICALS .....	57
3.2	CYTOTOXICITY OF ISOLATED AGROCHEMICALS AND THE MIXTURES .....	57
3.3	MULTIDRUG RESISTANCE .....	58
3.4	CELL RESPONSES .....	58
3.5	MORPHOLOGICAL FINDINGS .....	59
4	<b>DISCUSSION</b> .....	65
4.1	EXPOSURE TO AGROCHEMICALS ALTERS THE VIABILITY AND METABOLISM OF B16F1 CELLS .....	65
4.2	EXPOSURE TO AGROCHEMICALS NEGATIVELY AFFECTS THE NUMBER OF ATTACHED CELLS AND OF COLONIES.....	66

4.3	EXPOSURE TO AGROCHEMICALS NEGATIVELY AFFECTS THE MULTIDRUG RESISTANCE ACTIVITY. ....	67
4.4	FINAL COMMENTS .....	69
	<b>REFERENCES.....</b>	<b>69</b>
<b>2</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>82</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Agrotóxico é o termo utilizado para descrever substâncias destinadas à prevenção ou ao extermínio de pragas e doenças das culturas agrícolas; esta classe engloba os pesticidas, inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, nematocidas, bactericidas, substâncias destinadas para uso como reguladores de crescimento, ferormônios, desfolhantes e protetores de sementes (CARVALHO, 2006; PASSOS; REIS, 2013).

Em geral, os agroquímicos tornaram-se um componente importante dos sistemas agrícolas mundiais ao longo do século passado, permitindo um aumento notável dos rendimentos das culturas e da produção de alimentos. No entanto, resíduos destes podem persistir em solos, água e alimentos (IARC, 2013, CARVALHO, 2006). Neste sentido, com o aumento da utilização desses produtos, aumentaram também as preocupações com a contaminação e seus efeitos tóxicos (INOUE et al., 2003).

A incidência de problemas de saúde relativos à utilização de agroquímicos começou a ser notificada a partir de 1960, com as ocorrências de contaminação por organoclorados, classe esta que teve o uso de algumas moléculas proibidas no Brasil em 1985 pela Portaria nº 329, de 2/9/1985, do Ministério da Agricultura (ARAÚJO et al., 2007; BASTOS et al., 2011). Entre os inúmeros efeitos sobre a saúde humana está relatada também a incidência de câncer quando há exposição crônica a determinados agroquímicos (SILVA et al., 2005). Isso levou a *US Enviromental Protection Agency* (EPA) e a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) a estabelecerem uma designação toxicológica para as diferentes classes de agroquímicos como prováveis carcinógenos, ou não carcinógenos (IARC, 2013).

Nos últimos anos, várias alternativas foram criadas no sentido de reduzir o uso de agroquímicos; entretanto, algumas mudanças, tais como o advento de alimentos transgênicos, resistentes a algumas pragas, não resultaram na diminuição do uso dessas substâncias; como no caso dos herbicidas, uma vez que não impedem o desenvolvimento de algumas ervas daninhas no campo (AMARANTE JR; SANTOS, 2002).

Segundo a Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO), no Brasil, a utilização de agroquímicos nas lavouras saltou de 599,5 milhões de litros no ano de

2002 para 852,8 milhões de litros em 2011. Além disso, um terço dos alimentos consumidos cotidianamente pelos brasileiros está contaminado por agroquímicos, segundo dados encontrados pelo Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxicos (PARA) de amostras coletadas nas 26 Unidades Federativas do Brasil (PASSOS; REIS, 2013).

Selecionamos para este estudo, quatro agroquímicos amplamente utilizados atualmente no Brasil: a atrazina, um herbicida pertencente ao grupo químico das triazinas (WEBER et al., 2013); o carbaril, um inseticida pertencente ao grupo químico do metilcarbamato de naftila; o glifosato, que é um herbicida pertencente ao grupo químico da glicina substituída e o 2,4,6-Tribromofenol (2,4,6-TBF), pertencente à classe dos fenóis bromatados (ANVISA, 2017).

A atrazina é um herbicida utilizado para controlar ervas daninhas de folhas largas e gramíneas em uma variedade de cultivares (WEBER et al., 2013). É utilizado no Brasil em aplicações de pré e pós-emergência das plantas infestantes de abacaxi, cana-de-açúcar, milho, pinus, seringueira, sisal e sorgo; e classificado toxicologicamente como Classe III pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), ou seja, medianamente tóxico (ANVISA, 2017).

A atrazina possui uma baixa pressão de vapor e moderada solubilidade em água, adsorção à matéria orgânica e argila, elevada persistência em solos, hidrólise lenta e um alto potencial de escoamento superficial, podendo contaminar o solo e água (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 2001; CARMO et al. 2013), seu resíduo pode permanecer estável no leite (GARCÍA; SANTAEUFEMIA; MELGAR, 2012). Possui uma solubilidade em água de 6,2 mg/L e coeficiente de adsorção do solo ( $k_{oc}$ ) de 100 e 130 cm<sup>3</sup>/g (BARANOWSKA et al., 2008), sendo sua meia-vida variável em função do tipo de solo e da condição climática (QUEIROZ; MONTEIRO, 2000; CARMO et al. 2013). O limite máximo de contaminação ambiental permitido pela ANVISA é de 0,5 ppm.

O carbaril, por sua vez, é um inseticida classificado pela ANVISA como pertencente à classe toxicológica II, ou seja, altamente tóxico. Sua aplicação é foliar nas culturas de abacaxi, abóbora, algodão, alho, banana, batata, cebola, couve-flor, feijão, maçã, pastagens, pepino, repolho e tomate. Possui autorização para emprego agrícola e domissanitário, e sua ingestão diária aceitável (IDA) é de 0,03 mg/Kg.

Os carbamatos, entre eles o carbaril, usados como inseticidas e herbicidas, encontram-se entre as classes de pesticidas mais utilizadas no Brasil. Esses

compostos são muito instáveis em condições neutras e alcalinas em temperatura ambiente (GALLI et al. 2006). As propriedades de adsorção/desorção e a baixa persistência do carbaril no solo indicam uma moderada mobilidade, e, que o produto permanece em camadas superiores quando aplicado em concentrações usuais na agricultura. A degradação da substância no solo ocorre como resultado da atividade de microrganismos e por meio de efeitos físicos e químicos. O pesticida é submetido à hidrólise, oxidação e a outros processos químicos como, por exemplo, a fotólise. No campo, sob climas temperados e quentes, o tempo de meia-vida do pesticida não excede um mês (GARBELLINI; ULIANA, 2007).

O glifosato (N-fosfonometil glicina) é um herbicida classificado pela ANVISA na classe toxicológica IV, ou seja, pouco tóxica. Foi originalmente sintetizado em 1964 como potencial agente quelante industrial, e seu uso como herbicida foi descrito em 1971. É um potente herbicida de pós-emergência, largo espectro, não seletivo, capaz de controlar efetivamente 76 das 78 ervas daninhas mais agressivas (FRANZ, 1985). A ANVISA define seu emprego na aplicação pré-emergência das plantas infestantes nas culturas de algodão, ameixa, arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, coco, feijão, fumo, maçã, mamão, milho, nectarina, pastagem, pera, pêssigo, seringueira, soja, trigo e uva. Também é aplicado como maturador de cana-de-açúcar e na pós-emergência das plantas infestantes em florestas de eucalipto e pinus. O herbicida glifosato representa 60% do mercado mundial de herbicidas não seletivos (AMARANTE JR; SANTOS, 2002).

Segundo Araújo, Monteiro e Abarkeli (2003) o glifosato no solo é degradado pela atividade microbiana, no entanto, a afinidade entre glifosato e resíduos vegetais é marcadamente menor do que no solo, o que implica em um potencial risco ambiental (RAMPOLDI; HANG; BARRIUSO, 2008). A rápida adsorção no solo faz com que o glifosato não seja facilmente lixiviado (AMARANTE JR; SANTOS, 2002). A EPA estabeleceu o limite de 7,0 µg/L para amostras de água; e a ANVISA permite o seu uso agrícola e domissanitário e define sua IDA de 0,042 mg/Kg e o limite máximo de contaminação de 1,0 ppm.

Bohm et al. (2008) verificaram que a aplicação de glifosato no controle de plantas daninhas em cultivares de soja, resultou em teores elevados de glifosato e ácido aminometilfosfônico no solo. Nos grãos, os resíduos desse herbicida foram superiores ao permitido pela legislação vigente, que é de 10 mg.kg<sup>-1</sup>.



Adicionalmente selecionamos o 2,4,6-Tribromofenol (2,4,6-TBF), pertencente à classe dos fenóis bromados, que estão presentes nos ambientes naturais como substâncias naturais secretadas por organismos marinhos e como produtos industriais manufaturados (PEDERSÉN; SAENGER; FRIES, 1974; KING, 1986; YAMADA; TAKAHAMA; YAMADA, 2008). Podem ser formados também a partir da biodegradação de outros poluentes, tais como: benzenos bromados e alguns ésteres difenílicos bromados (WHO, 2005).

O 2,4,6-TBF vem sendo utilizado como um retardante de chama na produção de plásticos. Sua presença foi identificada juntamente com outros fenóis nas emissões de veículos a base de gasolina com chumbo e também pode ser formado como subproduto durante o processamento de alimentos e tratamento de água (GUTIÉRREZ et al., 2005; WHO, 2005).

A ANVISA classifica essa substância como um fungicida pertencente à classe dos organobromados, toxicologicamente pertencente à classe I, ou seja, extremamente tóxica; destinada ao uso exclusivo para tratamento de madeiras.

Fenóis bromados não são facilmente degradados e persistem no ambiente, no entanto, microrganismos podem degradar estes compostos. O 2,4,6-TBF existente na fase de vapor e de partículas na atmosfera é degradado e removido por deposição, pela reação com radicais hidroxila produzidos fotoquimicamente; sendo sua meia vida estimada em 20 a 40 dias. Estão presentes também dispersos em água e depositados no solo (WHO, 2005).

Foram detectadas concentrações máximas de 0,3 µg/L para o 2,4,6-TBF em águas doces e valores de 20 ng/L em água potável no Canadá. Na atmosfera foi encontrada a concentração de 380 ng/m<sup>3</sup> no ar a partir da combustão de resíduos halogenados, e concentração de 4500 ng/m<sup>3</sup> para a combustão de combustível veicular. A concentração em ambiente exposto ao 2,4,6-TBF variou de 0,6 a 6,3 mg/m<sup>3</sup>. Na biota que fazem parte da dieta humana, porções comestíveis contêm concentrações médias de até 198 e 2,36 µg/kg de peso seco em moluscos e crustáceos, respectivamente. Peixes marinhos bioacumulam até 39 µg/kg de peso seco. Além disso, fenóis bromados foram detectados no leite humano, no sangue e no tecido adiposo. O 2,4,6-TBF é rapidamente absorvido a partir do trato gastrointestinal em mamíferos e também excretado rapidamente pela urina e fezes (WHO, 2005).

Esta extensa utilização de agroquímicos aumenta a liberação de substâncias prejudiciais (xenobióticos) e toxinas no meio ambiente; que podem ser potencialmente capazes de atuar como indutores ou mesmo promotores do processo tumoral (GAMMON; SANTELLA, 2008; RUSYN; CORTON, 2012). Sendo extenso o número de maneiras pelas quais os agentes contribuem para a carcinogênese, envolvendo diversos processos bioquímicos e/ou moleculares (MARU et al., 2016; SMITH et al., 2016).

Adicionalmente, os pesticidas presentes no ambiente podem interagir entre si por diferentes mecanismos. Os componentes individuais de uma mistura podem influenciar a toxicidade um do outro e os efeitos resultantes desta interação podem diferir das previsões aditivas. Assim sendo, a identificação das respostas biológicas e moleculares das misturas de pesticidas, que podem estar presentes no ambiente, pode ser útil para avaliar ou prever a ocorrência de efeitos interativos que dão origem a respostas imprevisíveis (HERNÁNDEZ; GIL; LACASAÑA, 2017).

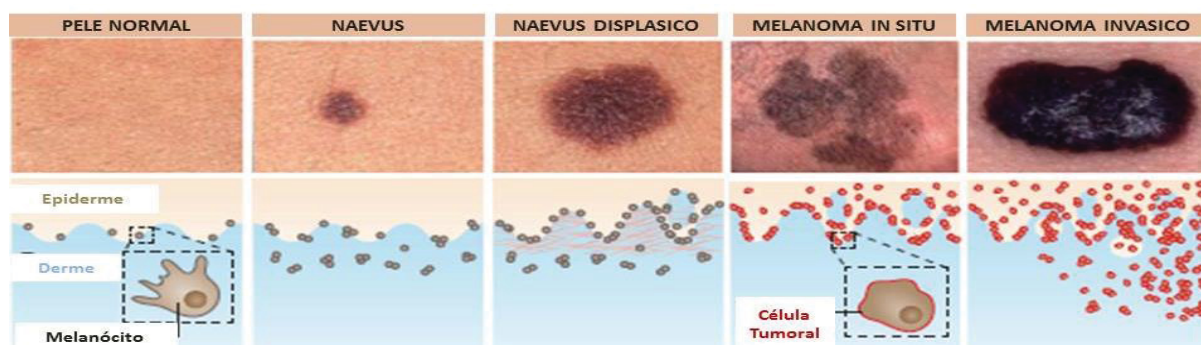
A carcinogênese é um processo altamente complexo do qual participam fatores de risco herdados e fatores de risco ambientais. Dentre os fatores ambientais, pode ser desencadeada por agentes físicos, biológicos e químicos. Quando desencadeada por agentes químicos, como é o caso da exposição aos agroquímicos, é um processo sequencial, que ocorre após a exposição a agentes genotóxicos, de ação direta ou indireta, e/ou a agentes não genotóxicos (epigenéticos); presentes no ambiente em geral, social, cultural, ocupacional e no consumo (KLAUNING; KAMENDULIS, 2008 apud BRASIL 2013).

Estudos em populações agrícolas identificaram um aumento no risco do desenvolvimento de diferentes tipos de câncer de pele, inclusive o melanoma; no entanto, não está clara a sua relação com a exposição ao sol ou a exposição aos agroquímicos (DENNIS et al., 2010). Ademais, estudos que investigam o desempenho de poluentes no prognóstico do câncer, ou seja, da sua evolução no sentido da malignidade não estão disponíveis até o presente momento; a progressão do melanoma ainda é um mecanismo complexo a ser elucidado. Shain; Bastian (2016) destacam que cada subtipo de melanoma pode progredir através de diferentes trajetórias evolutivas, passando ou até mesmo intercalando entre vários estágios de transformação.

O melanoma, acima mencionado, é formado a partir da transformação maligna de melanócitos, células produtoras de melanina, que se originam

embriologicamente da crista neural; sendo a pele o seu sítio primário (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). A maioria desses tumores (70%) se desenvolve na pele, e os demais têm origem de neurônios melanocíticos preexistentes (FREEDBERG et al. 2003 apud BRASIL, 2013).

Na pele exposta ao sol, os melanomas diferem em aspectos clínicos, histopatológicos e moleculares, sendo tumores heterogêneos, que podem ser subdivididos com base em seus níveis cumulativos de exposição à radiação ultravioleta (UV); sendo que os melanomas cronicamente expostos ao sol possuem maiores cargas de mutação, início tardio e aparecimento de locais anatómicos com maiores níveis de exposição. Uma neoplasia melanocítica também pode ser classificada com base no grau de sua progressão, variando de uma neoplasia benigna, como um *naevus*, que possui uma probabilidade muito baixa de progredir para o melanoma; a uma neoplasia maligna, como um melanoma metastático (SHAIN; BASTIAN, 2016) (Fig 01).



**Figura 01:** Morfologia do neoplasma melanocítico.  
Fonte: adaptado de Shain; Bastian (2016).

A incidência desta neoplasia é crescente, especialmente entre os caucasianos; e, o prognóstico é desfavorável em estádios avançados da doença normalmente resistente à terapia. O melanoma possui baixa capacidade de resposta aos tratamentos disponíveis, uma vez que a taxa de sobrevivência em cinco anos é inferior a 5%. Cerca de 90% da mortalidade por câncer de pele é causada pelo melanoma, e, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que em 2011 em todo o mundo, mais de 65.000 pessoas morreram acometidas pelo mesmo (KALAL; UPADHYA; PAI, 2017; KIM et al., 2017, LACINA et al., 2017).

Um dos motivos da falha terapêutica é que estas células tumorais podem apresentar resistência aos tratamentos quimioterápicos disponíveis. Vários

mecanismos de resistência foram descritos, e, o sistema de efluxo de drogas é o mecanismo mais comumente observado; envolvendo o aumento da expressão de membros da superfamília dos transportadores de efluxo de drogas (ABC), que transportam ativamente vários compostos quimioterapêuticos para fora das células (SZAKACS et al., 2006; FLETCHER et al., 2010).

Sendo assim, objetivamos verificar o mecanismo de resposta celular e de quimiorresistência através dos transportadores de efluxo de drogas de alguns agroquímicos de importância comercial e ambiental e seus metabólitos isolados ou associados, em linhagem de melanoma murino B16F1. Esta linhagem é menos metastática e quimiorresistente do que a linhagem B16F10 (Ehira et al., 2010), portanto, mudanças na malignidade podem ser melhor identificadas. Esse é um modelo adequado para a avaliação dos transportadores de resistência a múltiplas drogas - *multi-drug resistance* (MDR), uma vez que sua expressão em células tumorais, inclusive na linhagem em questão, já está bem estabelecida.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Uma vasta gama de pesticidas é usada atualmente para gerenciar pragas em ambientes agrícolas e domésticos. Consequentemente, os produtos alimentares podem conter simultaneamente diversos resíduos de pesticidas diferentes, conduzindo a uma exposição constante, de populações humanas, a misturas complexas de pesticidas através da sua dieta. Diversos autores identificaram resíduos de diferentes classes de agroquímicos em alimentos, em várias regiões do Brasil e no mundo.

Entretanto, estudos epidemiológicos são controversos nos achados que identificam a relação entre a exposição a agroquímicos e o aumento do risco de câncer (BRASIL, 2013). O grupo das clorotriazinas, por exemplo, comprovadamente influenciam respostas endócrinas de reprodução e desenvolvimento (COOPER et al. 2000; FREEMAN; BECCUE; RAYBUM, 2005; HOLLOWAY et al. 2008) mas sua relação com o desenvolvimento de neoplasias é contraditório. Além disso, diversos autores afirmam que não há evidências suficientes entre a exposição à atrazina e o desenvolvimento de câncer em humanos (MCELROY et al., 2007; JOWA; HOWD, 2011; SIMPKINS et al. 2011; BOFFETTA et al., 2013).

Com base na revisão de estudos científicos disponíveis, a EPA determinou em 2000 a atrazina como não potencialmente carcinogênica em seres humanos, levando em consideração que a evidência epidemiológica até a presente data não sugere fortemente uma ligação entre Atrazina e o câncer. Em contrapartida, a mesma agência não descarta essa correlação, uma vez que alguns achados epidemiológicos sugestivos para tumores específicos merecem análises adicionais.

Mais recentemente, Weber et al. (2013) avaliaram a exposição de diferentes concentrações de atrazina em embriões de *D. rerio* e identificaram a alteração de genes relacionados à atividade neuroendócrina, desenvolvimento do sistema reprodutivo, controle do ciclo celular e carcinogênese.

Estudos *in vitro* realizados por Lasserre et al. (2009) mostraram que a atrazina afetou a expressão de proteínas intracelulares que regulam o estresse oxidativo, tais como superóxido dismutase e proteínas estruturais como actina e tropomiosina, o que pode explicar as mudanças morfológicas das células MCF-7 (derivadas de câncer de mama). Ross et al. (2003) identificaram correlação entre a exposição à atrazina combinada com outros pesticidas e o aumento do risco do surgimento de linfomas não-Hodgkin's.

O carbaril, por sua vez, é relatado como um inibidor de acetilcolinesterase, causador de hipotireoidismo (LARINI, 1999); e indutor de redução do número e aumento de anomalias em espermatozóides (MENDES, 1997).

Com base na avaliação dos estudos já realizados, a EPA não considera evidências da carcinogenicidade do carbaril em humanos e considera não significativo o aumento da incidência de tumor em animais expostos em diversos estudos; por esta razão, tem classificado o carbaril como pertencente ao grupo D, ou seja, não cancerígeno para seres humanos. Porém, o carbaril é responsável por aumentar a incidência de neoplasias em vários tecidos de ratos após administração intraperitoneal (SHUKLA; ANTONY; MEHROTRA, 1992); e após altas doses por administração oral (EISENBRAND; SCHMAHL; PREUSSMANN, 1976).

McDuffie et al. (2001) e Tongzhang et al. (2001) relataram a relação entre a exposição ao carbamato e o risco de desenvolvimento de linfoma não-Hodgkin. Kachuri et al. (2013) observaram riscos de incidência de mieloma múltiplo na exposição à carbamatos. Chang et al. (2006) identificaram alterações que indicam neurotoxicidades em células do neuroblastoma SK-N-SH humano por carbamatos em concentrações subletais.

Dada a sua extensiva utilização e a restrição de estudos que correlacionam a exposição do carbaril ao desenvolvimento e progressão do melanoma, o mesmo foi incluído em nosso estudo.

O glifosato é considerado pelas autoridades reguladoras e os órgãos científicos como “não potencialmente cancerígeno”, principalmente com base nos resultados dos estudos de carcinogenicidade em ratos e camundongos (MINK et al. 2012). Roos et al. (2005) relatam que em seu estudo, a exposição ao glifosato não foi associada com a incidência de câncer em geral ou com a maioria dos subtipos de câncer estudados, porém há uma sugestão da sua relação com a incidência de mieloma múltiplo.

Li et al. (2013) observaram que o glifosato, e seu produto de degradação, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), ambos análogos à glicina, podem inibir o crescimento de oito linhagens de células tumorais. Martínez, Reyes, Reyes (2007) detectaram que o glifosato é tóxico para células mononucleares de sangue periférico humano.

Em contrapartida, Thongprakaisang et al. (2013) identificaram que o glifosato exerceu efeitos proliferativos no câncer de mama hormônio-dependente, enquanto Schinasi e Leon (2014) encontraram associações positivas entre linfoma de células B e o glifosato em uma meta-análise que reuniu 44 artigos.

Bolognesi et al. (2009) não encontraram relação significativa entre genotoxicidade em humanos e exposição ao glifosato. Já um estudo de genotoxicidade e citotoxicidade em uma linhagem de células epiteliais bucais (TR146) conduzido por Koller et al. (2012) identificaram efeitos genotóxicos induzidos por glifosato em concentrações que correspondem a uma diluição de 450 vezes a concentração utilizada para pulverização na agricultura.

Como seu potencial carcinogênico é ainda controverso (GEORGE et al., 2010) e levando em conta que em um estudo conduzido por George et al. (2010) foi identificada uma atividade pró-tumoral do glifosato utilizando modelos de carcinogênese de pele em ratos; esse agrotóxico foi incluído em nossos estudos.

Com relação ao 2,4,6-TBF, um estudo conduzido por Olsen et al. (2002), observou-se que o mesmo pode ligar-se ao receptor de estrogênio, deslocando até 43% do mesmo em concentrações de até 1  $\mu$ M. Viberg, Fredriksson e Eriksson (2003) demonstraram que a exposição neonatal a um éter difenil-polibromado (PBDE 153) pode induzir efeitos neurotóxicos em ratos.



Cantón et al. (2005) demonstraram, que o 2,4,6-TBF, pelo menos em estudos *in vitro*, pode interferir na esteroidogênese pela indução da aromatase, o que o classifica como um potencial disruptor endócrino. Do ponto de vista fisiológico, a indução da atividade da aromatase irá aumentar a produção de estrogênios, que estão envolvidos em vários processos como: reprodução, desenvolvimento e carcinogênese hormônio-dependente (CLEMONS; GOSS, 2001).

A restrita fonte de informações sobre os efeitos biológicos da exposição ao 2,4,6-TBF, bem como sua correlação com distúrbios neoplásicos incita o desenvolvimento de pesquisas adicionais, levando-nos a incluí-lo como alvo dos nossos estudos.

Nós também incluímos os principais produtos metabólicos dos agroquímicos e uma coleção de misturas. De acordo com Hernández, Gil, Lacasaña (2017) podem ser utilizadas duas abordagens para avaliar a toxicidade das misturas químicas: testar a mistura total ou testar os componentes individuais da mistura; por isso essa abordagem foi levada em consideração no desenvolvimento da nossa pesquisa.

Adicionalmente aos fatos expostos, vale ressaltar que, estudos que investigam a atuação de poluentes no prognóstico do câncer, ou seja, sua interação com a progressão, de forma a favorecer o desenvolvimento desta doença, não estão disponíveis até o presente momento.

Recentemente o nosso grupo demonstrou que algumas linhagens tumorais na presença de certos poluentes, além de não serem afetadas negativamente, se proliferavam e/ou apresentavam o metabolismo ativado ou alterando o sistema de transportadores de membrana envolvidos como o fenótipo MDR. Este mecanismo é um dos grandes responsáveis pela resistência de muitos tumores à quimioterapia. Esse indício levou à hipótese de que a exposição à xenobióticos poderia favorecer o agravamento do câncer ou interferir negativamente com o tratamento.

O objetivo deste trabalho é, portanto testar esta hipótese utilizando alguns agroquímicos de importância comercial e ambiental, isolados ou associados, avaliando a capacidade de alteração das respostas celulares, favorecendo a proliferação de células tumorais, ou interferir direta ou indiretamente no mecanismo de quimiorresistência.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Investigar se a exposição aos agroquímicos: atrazina, carbaril, glifosato, seus respectivos metabólitos e do 2,4,6-TBF afetam células de melanoma murino B16F1; através dos ensaios de viabilidade celular, metabolismo, proliferação e a expressão e atividade dos sistemas de transporte de efluxo de drogas.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a viabilidade celular para os compostos isolados, seus metabólitos e as misturas; através dos ensaios vermelho neutro e morte celular por citometria de fluxo, e o metabolismo celular através dos ensaios de MTT e *Alamar Blue*<sup>®</sup>;
- Examinar a proliferação celular através do ensaio cristal violeta e progressão do ciclo celular por citometria de fluxo;
- Identificar possíveis alterações na atividade dos transportadores MDR;
- Mensurar a capacidade de migração através do ensaio de *scratch*;
- Quantificar a formação de colônias através do ensaio Clonogênico;
- Avaliar a integridade celular através da microscopia eletrônica;
- Identificar a formação de espécies reativas de oxigênio;
- Quantificar a expressão do transportador MDR (subtipo ABCB5) e do modulador P53 através de *qPCR*.

### 1.3. DESENHO EXPERIMENTAL

#### 1.3.1 Divisão dos Capítulos:

No Capítulo I, avaliamos somente à exposição da linhagem B16F1 ao 2,4,6-TBF. No capítulo II avaliamos à exposição da linhagem B16F1 aos agroquímicos (atrazina, carbaril e glifosato), seus respectivos metabólitos (desetilatrazina, 1-naftol e ácido aminometilfosfônico) e as misturas.

Foram realizadas três misturas, levando-se em consideração possíveis contaminações ambientais ocasionadas pela associação da utilização dos agroquímicos:

- 1) Todos os agroquímicos e seus respectivos metabólitos: atrazina, carbaril, glifosato, desetilatrazina, 1-naftol e ácido aminometilfosfônico (AMPA).
- 2) Somente os agroquímicos parentais: atrazina, carbaril e glifosato.
- 3) Somente os metabólitos dos agroquímicos parentais: desetilatrazina, 1-Naftol e ácido aminometilfosfônico.

#### 1.3.2 Padronização das Concentrações

A escolha da concentração intermediária (CI) das moléculas utilizadas neste estudo foi baseada em dados de IDA, disponíveis na plataforma da agência nacional de vigilância sanitária. O 2,4,6-TBF teve suas concentrações estabelecidas com base nas concentrações encontradas no ambiente, visto que não há estabelecimento da ingestão diária aceitável para esta molécula. As concentrações dos metabólitos dos poluentes também se incluem nessa padronização (Tabela 01).

O 2,4,6-TBF não possui estudos sobre o seu metabolismo, e foi identificado em sedimentos oceânicos como um metabólito da fauna marinha, por isso é analisado somente o composto parental. Para estabelecer a concentração intermediária utilizamos como base a concentração do 2,4,6-TBF em peixes, levando-se em conta um estudo realizado por Devillers; Bintein; Domine (1996) que estabeleceu um fator de bioconcentração nos mesmos (Tabela 01).

**Tabela 01:** Estabelecimento das concentrações intermediárias dos agroquímicos e metabólitos:

Agroquímicos	Atrazina	Desetil-atrazina	Carbaril	1-Naftol	Glifosato	AMPA	2,4,6-TBF
CI (mg/kg):	0,03	0,03	0,003	0,003	0,042	0,042	0,2
MM (g/mol)	215,68	187,63	201,22	144,17	169,07	111,04	330,8

Nota: CI: Concentração Intermediária.

Fonte: dados da pesquisa

A relação entre as concentrações, inicialmente, seguiu uma escala logarítmica de base 10, 100 e 1000 inferiores e 10 e 100 superiores à IDA (Tabela 02). Com base nos ensaios preliminares de citotoxicidade: vermelho neutro, MTT e cristal violeta com 10% de soro fetal bovino (SFB); selecionamos duas concentrações (escala logarítmica de base 10 inferior e superior à IDA) (Figura 01).

**Tabela 02:** Estabelecimento das concentrações dos agroquímicos, metabólitos e misturas:

Agroquímicos	Abreviações	Concentração (µM)
Atrazina	Atz1	$1.4 \times 10^{-4}$
	Atz2	$1.4 \times 10^{-3}$
	Atz3	$1.4 \times 10^{-2}$
	<b>Atz4</b>	<b><math>1.4 \times 10^{-1}</math></b>
	Atz5	$1.4 \times 10^0$
	Atz6	$1.4 \times 10^1$
Desetilatrazina	Datz4	<b><math>1.6 \times 10^{-1}</math></b>
Carbaril	Carb4	<b><math>1.5 \times 10^{-2}</math></b>
1-Naftol	Naft4	<b><math>2.1 \times 10^{-2}</math></b>
Glifosato	Gli4	<b><math>2.5 \times 10^{-1}</math></b>
Ácido aminometilfosfônico	Ampa4	<b><math>3.8 \times 10^{-1}</math></b>
Atz+Carb+Gli+Datz+Naft+ Ampa	6-Pol3 / 6-Pol5	Concentração 3 ou 5
Gli+Atz+Carb	3-Pol3 / 3-Pol5	Concentração 3 ou 5
Datz+Naft+Ampa	3-Met3 / 3-Met5	Concentração 3 ou 5

Nota: A concentração 4 (ex: Atz4) refere-se à CI dos agroquímicos baseada na IDA. A partir da CI, padronizou-se duas concentrações (C) superiores (C5: 10x e C6: 100x superiores que a CI) e três inferiores (C3: 10x, C2: 100x e C1: 1000x inferiores que a CI). As concentrações dos agroquímicos e metabólitos foram estabelecidas e exemplificadas pela atrazina nesta tabela. Para as misturas, somente as concentrações C3 e C5 dos agroquímicos e metabólitos foram utilizadas.

Fonte: dados da pesquisa

No Capítulo I, prosseguimos com essas mesmas concentrações para os demais ensaios. No capítulo II, mantivemos essas concentrações para os ensaios de citotoxicidade, interação com os transportadores de efluxo de drogas (MDR), e os ensaios confirmatórios (Vermelho Neutro, MTT e Cristal Violeta 10% e 2% SFB, Alamar Blue®); para as respostas celulares adicionais (Migração Celular, Ensaio

Clonogênico, Espécies Reativas de Oxigênio e *qPCR* P53), e complementar de análise de interação MDR (*qPCR* ABCB5) selecionamos apenas a concentração escala logarítmica de base 10 inferior à Concentração Intermediária (C.I.) (Figura 01).

### 1.3.3 Padronização da Linhagem Celular

Para a nossa pesquisa, selecionamos a linhagem de melanoma murino B16F1 porque a mesma é menos metastática e quimiorresistente que a B16F10, favorecendo a observação de alterações nas respostas celulares. Além disso, esta linhagem possui uma expressão significativa de transportadores de efluxo em comparação com o melanócito.

As células de melanoma murino B16F1 (Banco de Células do Rio de Janeiro, Brazil) foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 40µg/mL de Gentamicina. As linhagens celulares foram mantidas a 37°C em incubadora com atmosfera umidificada e 5% de CO<sub>2</sub>. O plaqueamento foi padronizado individualmente para cada experimento, levando-se em consideração as peculiaridades e critérios a serem avaliados, e estão detalhados individualmente no tópico de metodologia em cada capítulo.

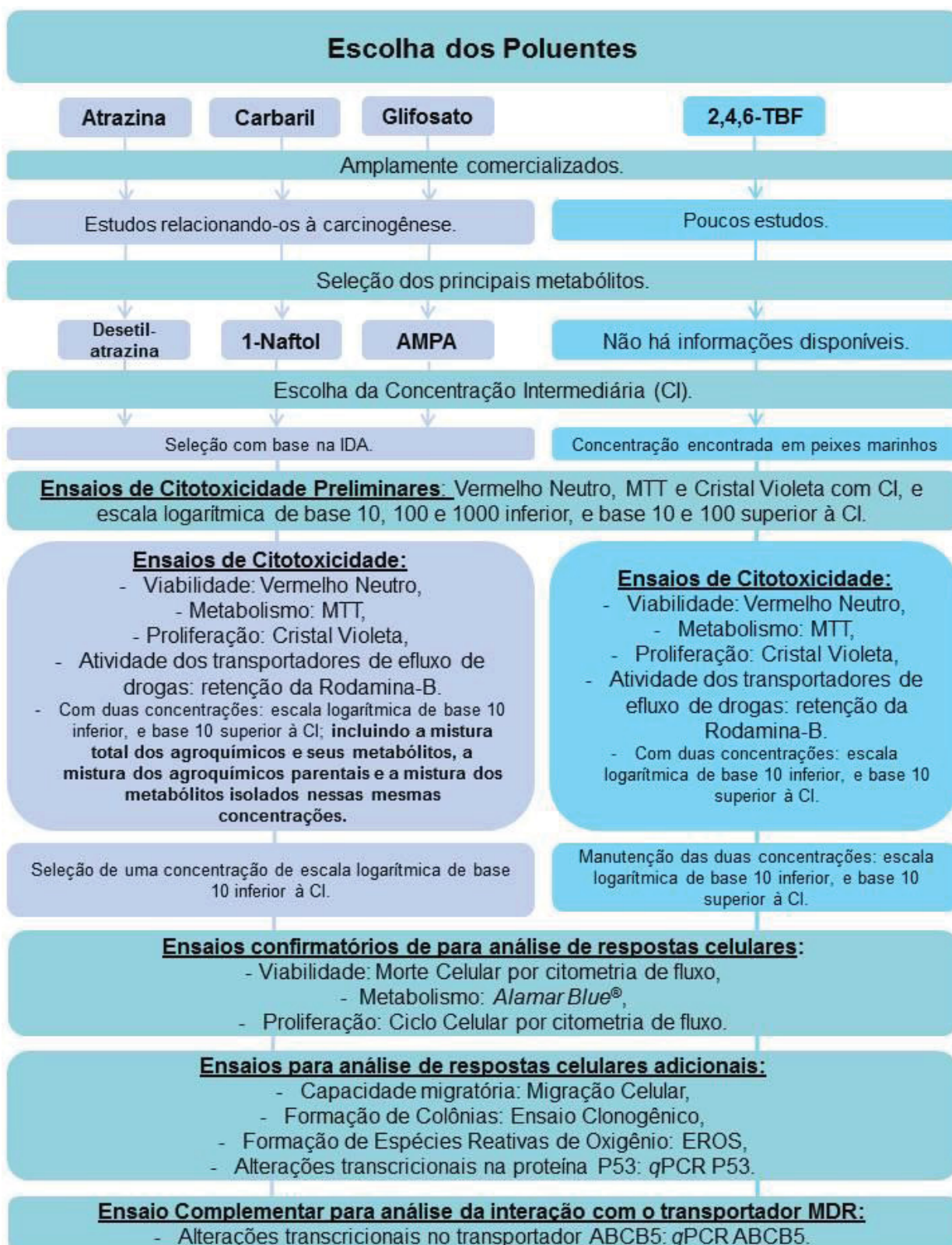
### 1.3.4 Padronização dos Tempos de Exposição

Para as análises utilizamos os tempos de 24 e 48 horas de exposição na maioria dos ensaios; com exceção do ensaio do *Alamar Blue*<sup>®</sup>, que foi analisado por um período completo de 72 horas.

O plaqueamento, bem como o tempo de exposição foram previamente padronizados com base nos ciclos mitóticos da linhagem B16F1 e a confluência adequada para análise dos resultados.

### 1.3.5 Financiamento da Pesquisa

O desenvolvimento desta pesquisa contou com suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.



**Figura 01:** Organograma metodológico.

Fonte: o autor.



## **CAPÍTULO I**

**Tribromophenol affects the metabolism, proliferation, migration and multidrug resistance transporters activity of murine melanoma cells B16F1**

Publicado na Toxicology in vitro (Qualis A2)

## **Tribromophenol affects the metabolism, proliferation, migration and multidrug resistance transporters activity of murine melanoma cells B16F1**

Yvanna Carla de S. Salgado<sup>a\*</sup>, Marianna Boia Ferreira<sup>a</sup>, Jessica Zablocki da Luz<sup>a</sup>, Francisco Filipak Neto<sup>a</sup>, Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Cx. Postal 19031, CEP 81.531-990, Curitiba, PR, Brazil.

\*Corresponding authors:

Yvanna C S Salgado  
[yvannacarla@hotmail.com](mailto:yvannacarla@hotmail.com)  
Ciro A Oliveira Ribeiro  
[ciro@ufpr.br](mailto:ciro@ufpr.br)  
Tel: +55 (41) 3361-1680.

### **ABSTRACT**

Murine melanoma cells B16F1 were exposed to the flame retardant and wood preservative chemical 2,4,6-tribromophenol (TBP) during 24 and 48 h, at the concentrations found in human diet. TBP-exposed cells had increased MTT and Alamar blue® metabolism and ABCB5 mRNA levels (qPCR), but the cells had decreased proliferation (crystal violet assay), migration (scratch assay), and drug-efflux transporters activity (rhodamine B efflux assay). Exposure to TBP did not affect the cell viability (neutral red and annexin V-PI assays), colony formation (colony number, clonogenic assay), and the levels of reactive oxygen species (DCF probe) or P53 mRNA (qPCR). The tested TBP concentrations had low toxicity to melanoma cells B16F1. However, dual effect on metastatic profile and chemoresistance suggests that the increase of ABCB5 positively modulates the cell chemoresistance, but decreases cell migration and proliferation. These findings may be explored in cancer therapy.

Keywords: tribromophenol, MDR, melanoma, B16F1, therapy, migration

### **1. INTRODUCTION**

Brominated phenols such as 2,4,6-Tribromophenol (TBP) are environmental persistent contaminants released by natural (e.g., secretion by marine organisms) and industrial activities (Kotterman et al. 2003; Yamada et al., 2008; Aznar-Alemany

et al., 2017). This compound is widely used as a flame retardant, plastic production or even as antimicrobial and insecticide agent in wood preservation. Additionally, TBP is a by-product of food and milk processing, and water treatment (Gutiérrez et al., 2005; WHO, 2005; Mardones et al., 2008). The industrial production of TBP in 2001 was of 2500 tons/year in Japan and 9500 tons/year worldwide (IUCLED, 2003; WHO, 2005). Recently studies showed that TBP and other phenols were identified in vehicle emissions, but more specifically were also found in milk, blood, adipose tissue and placenta of humans (Hovander et al., 2002; Stapleton et al. 2011; Fujii et al., 2014; Leonetti et al., 2016). There are no established limits for daily ingestion of 2,4,6-TBP, and the Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) concluded that establishing a value of health-based guidance for this compound was not adequate due to limitations and uncertainties in the databases (Alexander et al., 2012).

To date, there is little information about TBP biological effects. Some studies report effects such as plasma protein binding, endocrine and transcriptional disorders (Ghosh et al., 2000; Olsen et al., 2002; Cantón et al. 2005; Hamers et al., 2006; Ezechiáš et al., 2012; Lee et al., 2016), while an anticancer potential was described for other marine bromophenols (Shi et al., 2009; Liu et al., 2012; Wu et al., 2015; Liu et al., 2014).

Death by cancer is increasing worldwide (Ferlay et al., 2015) and melanoma is among the most lethal types of human cancers, accounting for 4-5% of all skin cancers (Riker et al., 2010). Melanoma is caused by malignant transformation of melanocytes with multifactorial origin, which may include endogenous factors such as genetic predisposition or exogenous, particularly due to the exposure to sunlight (Lo; Fisher, 2014). The etiology of cancer due to UV radiation and exposure to chemicals have been extensively investigated, but there is no data about the influence of environmental contaminants on the resistance of tumor cells to chemotherapy or in the cancer prognosis. Despite of that, studies show that some contaminants can cause increases of cell viability, proliferation and drug-efflux transporters activity (Payne et al., 2001; Epel et al., 2008), potentially interfering with tumor cell behavior.

In the current study, the effects of 2,4,6-tribromophenol were evaluated on murine melanoma cells B16F1, through the assays of cell viability, metabolism, proliferation, and the expression and activity of drug-efflux transporters systems.

## 2 METHODS

### 2.1 EXPERIMENTAL DESIGN

Stock solutions of 2,4,6-tribromophenol (Sigma Aldrich, >99% purity) were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and kept at -20 °C. Murine melanoma B16F1 cells (Rio de Janeiro Cell Bank, Brazil) were cultured in high glucose DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 40 mg.l<sup>-1</sup> of gentamicin sulfate at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. For the experiments, the cells were initially cultured for attachment during 24 h and then exposed to 2,4,6-tribromophenol in the culture medium for 24 and 48 h, with a control group kept in parallel. The cells were exposed to realistic TBP concentration (6x10<sup>-1</sup> μM, intermediate concentration) based on TBP levels reported in marine seafood 356 ng g<sup>-1</sup> (Aznar-Alemany et al 2016) and 270 ng g<sup>-1</sup> in benthonic fish (Whitfield et al. 1998 apud Koch and Sures, 2018), and 10-, 100- and 1000-fold lower (low concentrations) and 10-, 100-fold higher (high) concentrations. DMSO final concentration in the control and TBP-exposed groups was 0.05%.

### 2.2 CYTOTOXICITY ASSAYS

After exposure to TBP, the cells seeded onto 96-well microplates (2x10<sup>3</sup> cells/well) were analyzed through neutral red retention (incubation: 40 μg.ml<sup>-1</sup> neutral red for 2 h), MTT metabolism (incubation: 0.5 mg.ml<sup>-1</sup> of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide for 1 h), violet crystal (staining: 0.2% crystal violet for 15 min) assays, according to the protocols of Machana et al. (2011), Poskus (2009), and Kueng et al. (1989). For alamar blue<sup>®</sup> assay, 20 μl of Alamar Blue<sup>®</sup> was added to each well of the 96-well microplate, and the absorbance was measured at 2, 4, 6, 24, 48 and 72 h at 570 nm and 600 nm (Fields and Lancaster, 1993).

### 2.3 REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) LEVELS AND DRUG-EFFLUX TRANSPORTERS ACTIVITY

### 2.3.1 ROS:

After exposure to TBP, the cells plated onto 96-well microplates ( $2 \times 10^3$  cells/well) were incubated with 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate ( $10 \mu\text{M}$ , 15 min,  $37^\circ\text{C}$ ), washed and resuspended with PBS for fluorescence quantification (Ex. 488 nm, Em. 530 nm (Liebel et al. 2015)).

### 2.3.2 Drug-efflux transporters

After exposure to TBP, the cells plated onto 96-well microplates ( $2 \times 10^3$  cells/well) were incubated with rhodamine B ( $1.0 \mu\text{M}$ , 30 min,  $37^\circ\text{C}$ ), washed, resuspended with PBS, frozen at  $-76^\circ\text{C}$ , thawed and transferred to black microplate for fluorescence quantification (Ex. 485 nm, Em. 530 nm). For positive control, some cells were treated with verapamil ( $20\text{--}60 \mu\text{M}$ ) for 24 h prior to incubation with rhodamine B (Liebel et al. 2015).

## 2.4 CELL CYCLE AND DEATH ASSAYS

The cells were seeded onto 24-well plates ( $2.5 \times 10^5$  and  $1.25 \times 10^5$  cells/well, for 24 and 48 h-exposure, for the cell cycle assay, and  $1.25 \times 10^5$  cells/well for the cell death assay), cultured for 12 h in FBS-free culture medium and then exposed to TBP for 24 and 48 h. Then, the cells were trypsinized ( $0.25\%$  trypsin,  $0.02\%$  EDTA), washed, and incubated with propidium iodide/RNase (BD Pharmingen™ PI/RNase kit, BD Biosciences) for cell cycle assay, and with FITC-Annexin V/propidium iodide (PI) Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) for cell death assay, according to the manufacturers. Data acquisition ( $>10,000$  events/replicate) was performed in the BD FACSCalibur flow cytometer.

## 2.5 SCRATCH AND CLONOGENIC ASSAYS

### 2.5.1 Scratch assay

The cells were seeded onto 96-well plates ( $5 \times 10^4$  cells/well) and, upon reaching 90% confluency; the culture medium was replaced by fresh medium without

FBS. After 10 h, 10  $\mu$ M of mitomycin were added and the cells were additionally cultured for more 2 h. Then, a scratch was performed in the middle of each well of the microplate with a 10  $\mu$ l-pipette tip. The suspended cells were removed, the culture medium was replaced by FBS-free culture medium containing TBP, and the cells were cultured for up to 48 h. Images of the scratch were captured after 0, 24 and 48 h under inverted microscope (40x objective). After 48 h–exposure, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min at 4 °C and stained with Rosenfeld dye (Liang et al., 2007).

### 2.5.2 Clonogenic assay

250 cells were seeded onto 24-well plates, cultured in culture medium with 10% FBS for 12 h, and then in FBS-free medium for 20 h. The cells were exposed to TBP for 24 and 48 h in culture medium with 10% FBS and maintained thereafter in culture medium with 10% FBS during 5 days, with medium replacement at 3<sup>rd</sup> day. Then, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min at 4 °C, and stained with Rosenfeld dye for colonies counting under inverted microscope (Franken et al., 2006). Only groups containing 50 or more cells were counted.

### 2.6 qPCR

The cells seeded onto 96-well microplates ( $2 \times 10^3$  cells/well), and exposed to TBP. Total RNA was extracted from the cells using TRIzol® (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. The RNA concentrations were measured with the NanoVue Plus spectrophotometer (GE Healthcare) and 10  $\mu$ g of total RNA was used. Real-time PCR was performed using the Power SYBR® Green RNA-to-CT 1-Step Kit (Applied Biosystems). Primers for ABCB5 (sense 5'-GTGGCTGAAGAAGCCTTGTC- 3', anti-sense 5'- TGAAGCCGTAGCCCTCTTTA-3') were obtained from Ehira et al. (2010) and P53 (sense 5'- GTCACAGCACATGAC GGA GG -3'; anti-sense 5'- TCTTCCAGATGCTCGGGATAC -3') and (sense 5'- -3'; anti-sense 5'- -3') were obtained from Primer Bank. The relative quantification value for each target gene was compared with the endogenous control ( $\beta$ -actin), which was expressed as  $2^{-(Ct-Cc)}$  (Ct and Cc are the mean threshold cycle differences after normalizing to  $\beta$ -actin).



## 2.7 STATISTICAL PROCEDURES

Three independent experiments were performed for all the endpoints. The number of replicates per experiment was: 5 replicates for MTT, neutral red, violet crystal and drug-efflux transport assays; 3 replicates for ROS, scratch, qPCR and for clonogenic assays and 2 replicates for alamar blue, cell cycle and cell death assays. The data were evaluated for normality, and one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison tests were performed. A value of  $p < 0.05$  was assumed as statistically significant.

## 3. RESULTS

### 3.1 PROCEDURES TO SELECT THE TBP TEST CONCENTRATIONS

Initially, a screening with six concentrations of TBP was performed for selection of two concentrations for further investigation. TBP had no effects on cell viability, determined by neutral red retention, which evaluates the endolysosomal system integrity (fig. 1A), but led to slight increases of MTT metabolism by cell dehydrogenases (5.9% for  $6 \times 10^0 \mu\text{M}$ ; 5.6% for  $6 \times 10^1 \mu\text{M}$ ) at 24 h-experiment (fig. 1B). TBP exposure led to decreased number of attached cells for  $6 \times 10^{-1} \mu\text{M}$  at 48 h-experiment (7.4%) and  $6 \times 10^1 \mu\text{M}$  at 24 h- and 48 h-experiments (8.4%, fig. 1C). Based on the low toxicity of TBP in intermediate tested concentration to B16F1 cells, the 10-fold lower ( $6 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ ) and a 10-fold higher concentration ( $6 \times 10^0 \mu\text{M}$ ) were selected for further assays.

### 3.2 CELL RESPONSES TO TBP

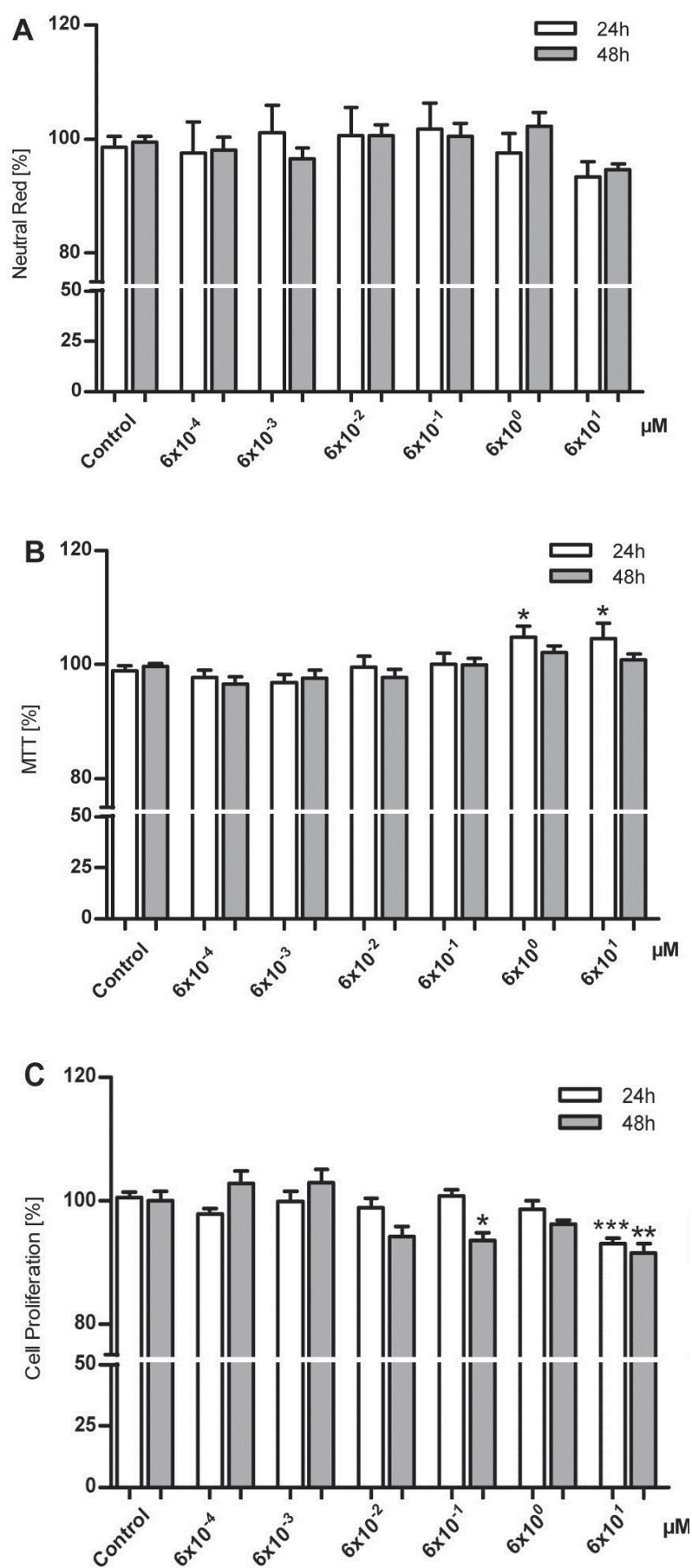
The exposure to  $6 \times 10^{-2} \mu\text{M}$  of TBP caused a decrease of mitochondrial metabolic activity (Alamar Blue<sup>®</sup> assay) at 4 h. The exposure to  $6 \times 10^0 \mu\text{M}$ , in the same time that showed an initial increase of mitochondrial metabolic activity (at 2 h) decreasing after 4 h of exposure, and a successive increases of metabolism was observed after 24 - 72 h (fig. 1D).

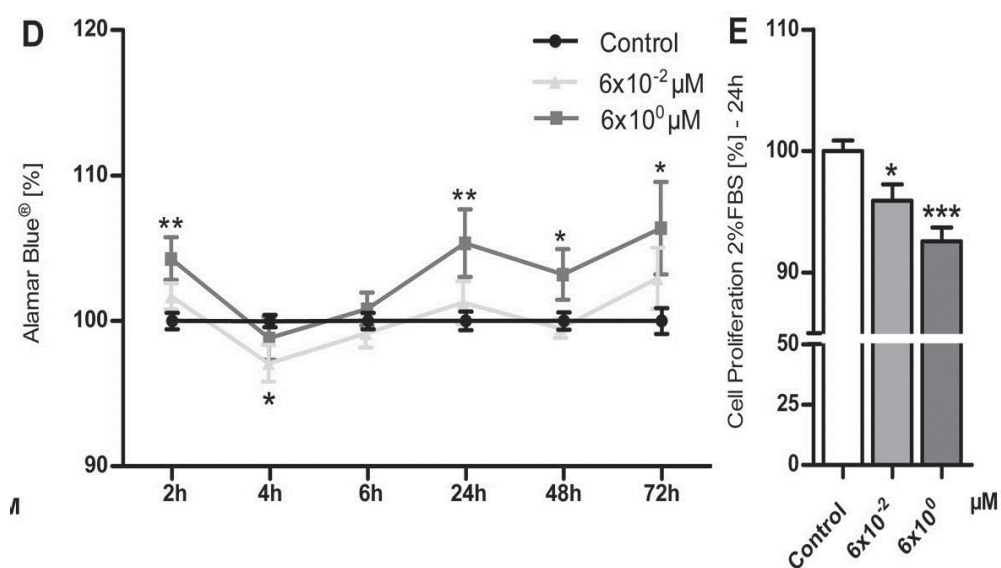
TBP did not cause cell death, but a slight increase of viable cells (2.1 %) exposed to  $6 \times 10^{-2} \mu\text{M}$  of TBP occurred at 48 h-experiment (fig. 2D). Additionally, TBP

had no effects on cytoplasmic P53 mRNA levels (fig. 4A). Due to the mitogenic effect of FBS, the cells were exposed to TBP at 2% FBS, since this decrease of FBS had no effect on cell viability. The reduction to 2% FBS showed a reduction of MTT metabolism and proliferation without effect on the neutral red retention after 24 h-exposure (data not shown). At 24 h-experiment, decreases on cell proliferation were observed for both, the lowest and highest TBP concentrations (4 % for  $6 \times 10^{-2} \mu\text{M}$  and 7.4 % for  $6 \times 10^0 \mu\text{M}$ ; fig. 1E). TBP did not affect reactive oxygen species levels (fig. 2A) and the percentage of cells at different phases of cell cycle at 24 h-experiment (fig. 2C). For the 48 h-experiment, the percentage of cells in different phases the cell cycle depended on the concentration: G1 phase ( $6 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ : decrease;  $6 \times 10^0 \mu\text{M}$ : increase) while G2/M ( $6 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ : increase;  $6 \times 10^0 \mu\text{M}$ : decrease; fig. 2C). To analyze the metastatic potential and malignancy of TBP, the colony formation and cell migration were analyzed. TBP did not affect the number of colonies, neither the size of them (fig. 3A and 3B); but TBP partially impaired cell migration at 48 h-experiment, leading to a larger cell-free scratch area (2.5-fold increase) after exposure to  $6 \times 10^0 \mu\text{M}$  of TBP (fig. 3D).

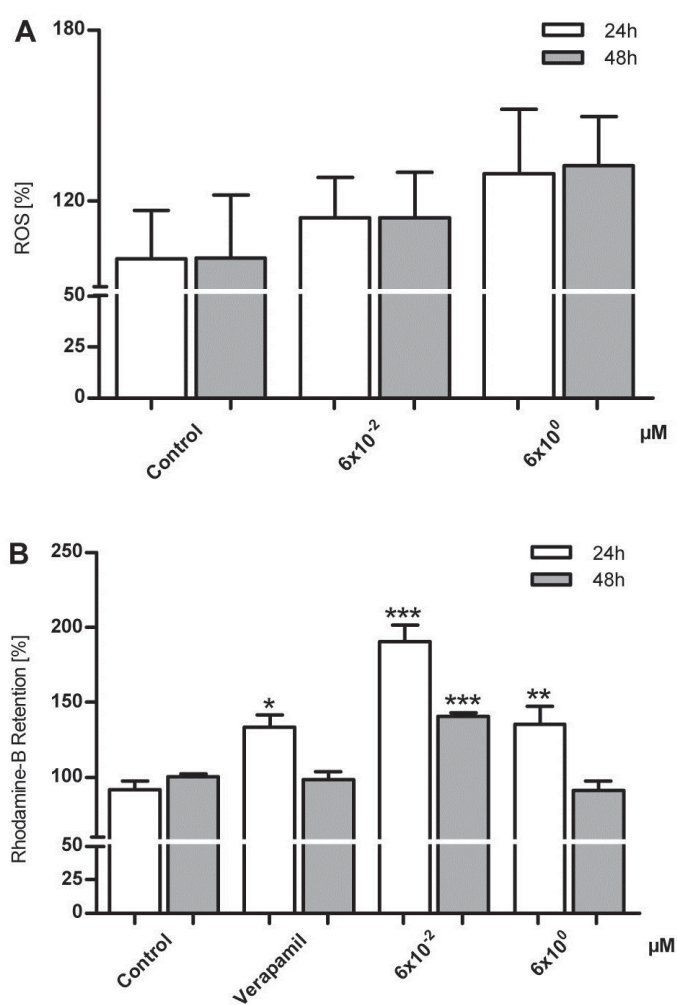
### 3.3 MULTIDRUG RESISTANCE ACTIVITY

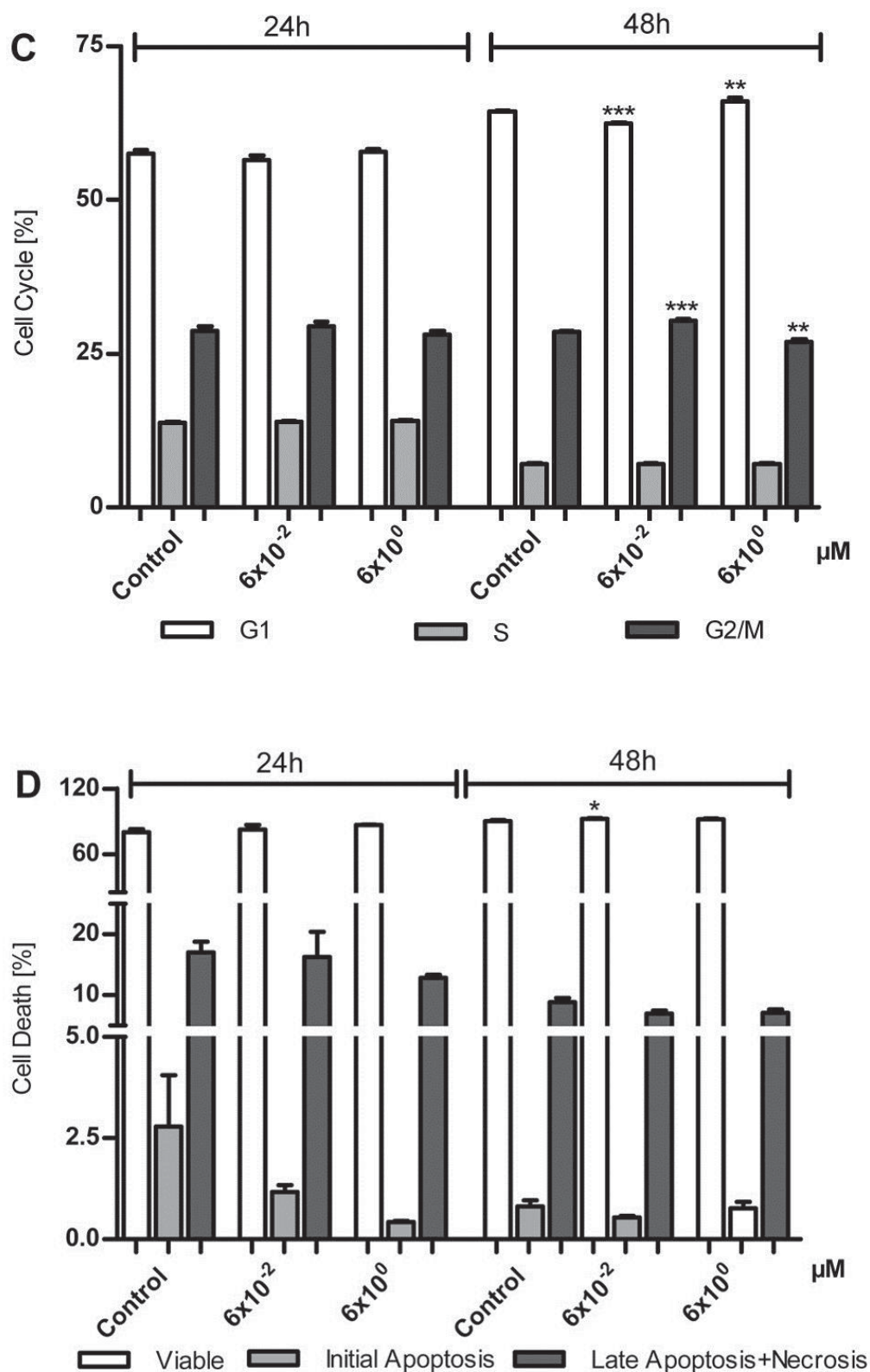
Both exposure periods modulate the activity of drug-efflux transporters after exposure to  $6 \times 10^{-2}$  and  $6 \times 10^0 \mu\text{M}$  of TBP. The intracellular concentration of rhodamine B increased, particularly, for 24 h-experiment (99% for  $6 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ ; 44% for  $6 \times 10^0 \mu\text{M}$ ; fig. 2B). The expression of genes related with membrane ABC transporters (ABCB5) increased time-dependently (24 h: 130%; 48 h: 381%) after the exposure to  $6 \times 10^0 \mu\text{M}$  of TBP (fig. 4B).



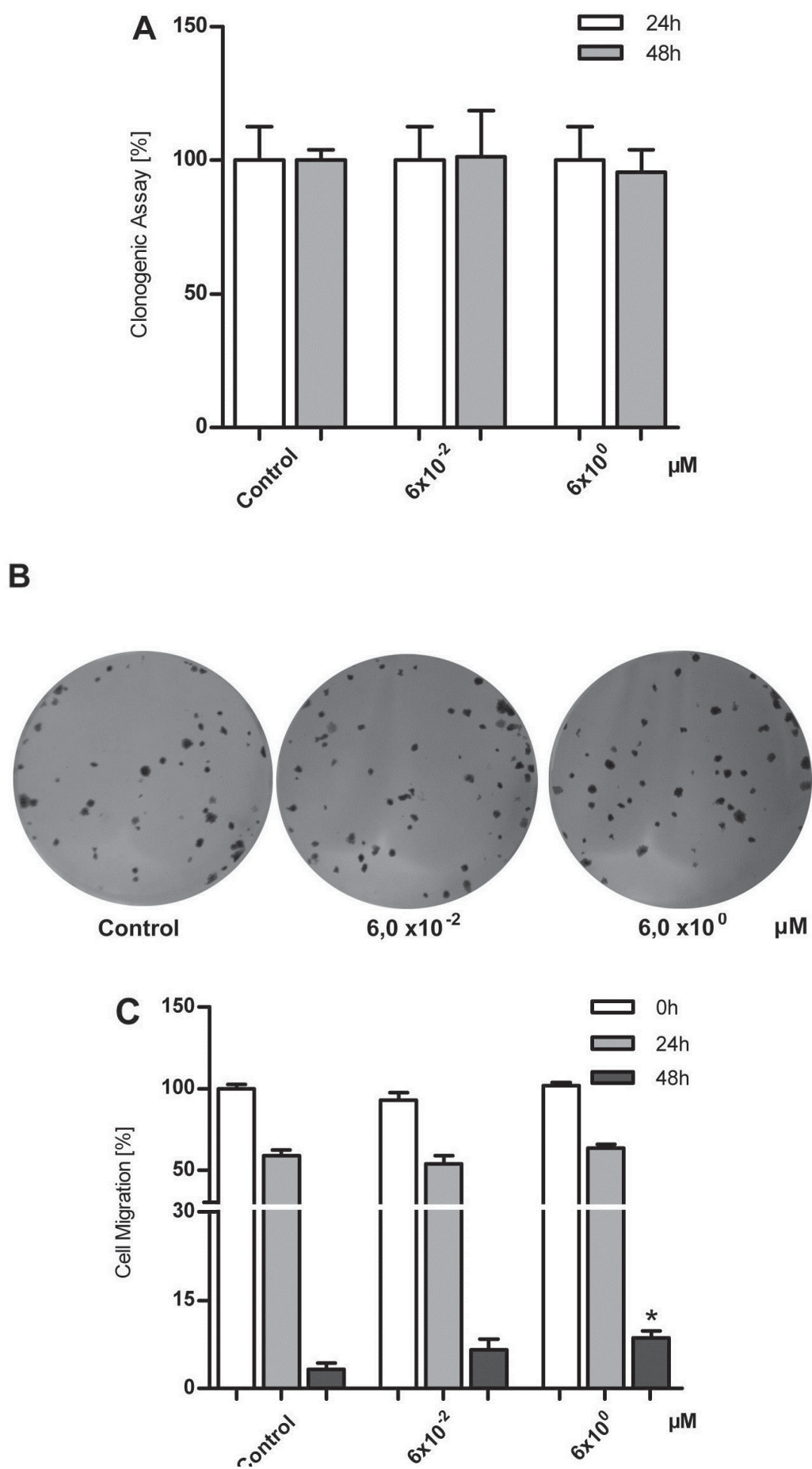


**Figure 1.** Neutral Red assay (A). MTT assay (B). Cell Proliferation assay (C). Alamar Blue® assay (D). Cell Proliferation assay with 2% FBS (E). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  indicate differences of 2,4,6-TBP groups in comparison to the control group. ANOVA+Dunnnett's. Data from three independent experiments (NR, MTT and cell proliferation: 5 replicates/experiment; Alamar blue®: 2 replicates/experiment).

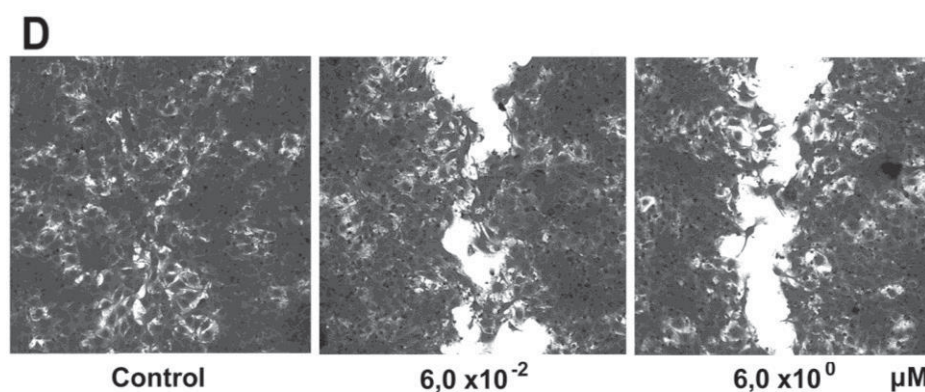




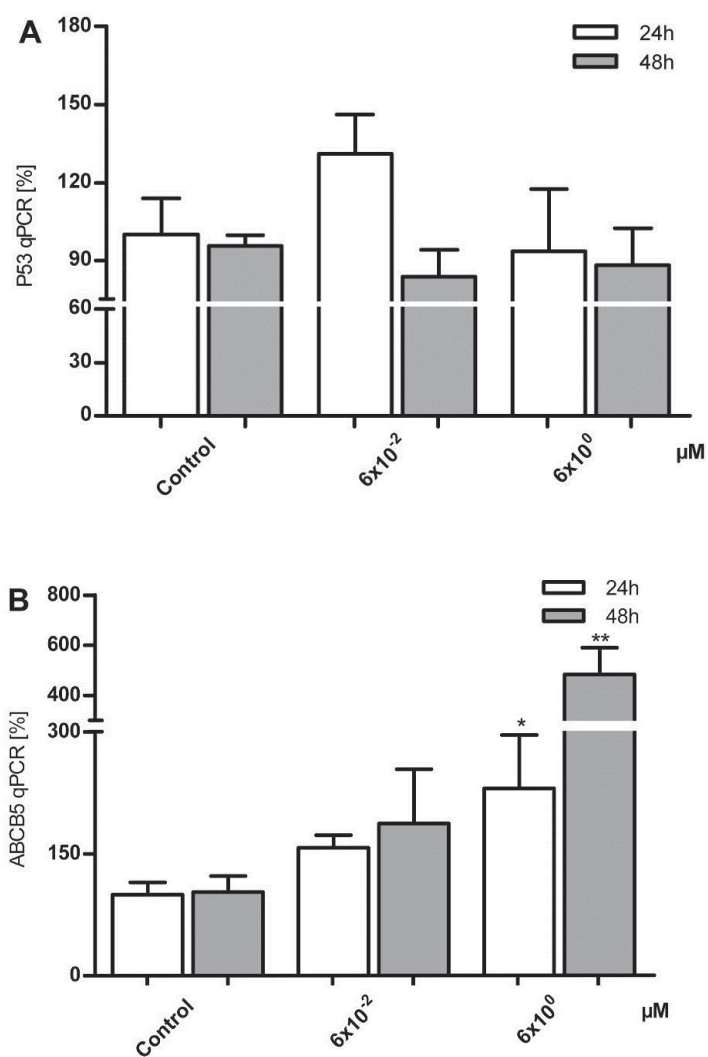
**Figure 2:** ROS levels (A). Rhodamine-B accumulation (B) normalized by cell viability evaluated by neutral red assay. Cell Cycle in percentage of cells (C). Cell Death in percentage of cells (D). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  indicate differences of 2,4,6-TBP groups in comparison to the control group. ANOVA+Dunnett's. Data from three independent experiments (Rhodamine-B: 5 replicates/experiment; cell cycle and death: 2 replicates/experiment).







**Figure 3.** Clonogenic Assay (A and B). Cell Migration Assay (C - percentage of scratch space, i.e. area not occupied by cells due to cell migration inhibition; and D – cell migration in scratch space). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  indicate differences of 2,4,6-TBP groups in comparison to the control group. ANOVA+Dunnnett's. Data from three independent experiments (3 replicates/experiment).



**Figure 4.** P53 qPCR (A). ABCB5 qPCR (B). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  indicate differences of 2,4,6-TBP groups in comparison to the control group. ANOVA+Dunnnett's. Data from three independent experiments (3 replicates/experiment).

## 4 DISCUSSION

The current study showed that TBP is slightly cytotoxic to melanoma cell B16F1 leading to alteration of mitochondrial metabolism, decrease of cell proliferation and efflux of rhodamine B, and increase of ABCB5 gene expression. Although many of these findings present consistent information, the most important highlight is the use of realistic concentrations of TBP. Few studies have described effects of TBP after *in vivo* and *in vitro* exposure and no studies have used very low concentrations of TBP. Indeed, according to the Concise International Chemical Assessment Document, the concentration of  $6 \times 10^{-2}$   $\mu\text{M}$  of TBP is about half of that bioaccumulated in edible fish portions ( $39 \mu\text{g.kg}^{-1}$  or  $0.12 \mu\text{M}$ ), and  $6 \times 10^0$   $\mu\text{M}$  is lower than the concentration found in edible portions of crustaceans ( $2360 \mu\text{g.kg}^{-1}$  or  $7.13 \mu\text{M}$ ). In addition, Thomsen et al. (2002) reported concentrations of TBP of 0.077-1.3  $\text{ng.g}^{-1}$  of lipids in serum ( $\approx 1.9 \times 10^{-6}$  -  $3 \times 10^{-5}$   $\mu\text{M}$ , considering the lipid content of 800  $\text{mg.dl}^{-1}$  in blood) of 40-50 years-old men during 1977 to 1999 in Norway. Since there are a continuous increase of industrial production (IUCLED, 2003) over the years, and diverse routes of human population exposure, the concentrations of TBP used in the current study could correspond to the concentrations that humans may be exposed to. Unfortunately, there are no recent studies on the bioavailability of TBP in humans. Then, the data presented in here bring relevant data on the toxicity of TBP and open many opportunities of investigations related to TBP toxicity and risk of exposure.

Exposure to TBP led to increased mitochondrial (Alamar Blue®) and cell (MTT) metabolism at  $6 \times 10^0$   $\mu\text{M}$ , revealing an energy demand by cell due to exposure, despite of no relevant changes of cell viability. These findings suggest an early cell response extending to 24 and 48 h-experiment. Under higher concentration, TBP led to hormesis response starting at 2 h until 72 h-experiment. Absence of cytotoxicity has been reported to rat hepatocytes (C57BL/6) exposed to up to 30  $\mu\text{M}$  of TBP (Pullen et al. 2003) and human adrenocortical carcinoma cell line (H295R) exposed to 1- 10  $\mu\text{M}$  of TBP (Cantón et al. 2006). In general, low concentrations of TBP are not toxic to cells under short-term exposure, but perturbation of mitochondrial metabolism may represent an important issue for further studies. Increases of MTT metabolism were not associated with cell proliferation, since cell proliferation decrease at  $6 \times 10^{-1}$   $\mu\text{M}$  (48 h) and  $6 \times 10^1$   $\mu\text{M}$  (24 - 48 h) at 10% FBS, decreased confirmed with exposure at 2% FBS. The cell cycle assay

corroborated this finding, with increased percentage of cells in G1 phase and decreased in G2-M phase ( $6 \times 10^0 \mu\text{M}$ , 48 h-exposure). According to Patel et al. (2013), the MTT assay is very useful to distinguish between cell proliferation and activation, which explain the results of increased metabolism and reduction of proliferation reported in the current study.

Cell cycle control is performed by a set of kinases, cyclins, inhibitors, the tumor suppressor gene P53, and other transcriptional elements. Induction of G1 checkpoint is important for DNA repair and induction of apoptosis, but DNA integrity is also checked in the G2 phase, ensuring precise genome duplication (Lee et al., 2015). However, Olsen et al. (2002) reported no significant effects on the proliferation of estrogen-dependent human breast cancer cell line (MCF-7) exposed to much higher concentrations (0.1 mM) of TBP.

TBP did not affect the levels of ROS and P53 mRNA transcripts. P53 is a transcription factor that can delay or halt the progression of the cell cycle, induce apoptosis, senescence and limit cell proliferation in response to cell stress (Lee et al. 2015); about 19% of melanomas have mutated P53 proteins. Recent studies indicate that marine bromophenols may be promising anticancer agents, with reports of reduction of cell adhesion, migration and invasion *in vitro* in several tumor cell lines, and so with important anti-metastatic effects (Wu et al., 2015; Shi et al., 2009; Liu et al., 2012, 2014). TBP caused a reduction of the migration capacity of B16F1 cells ( $6 \times 10^0 \mu\text{M}$ ), but not affected the number of cells. However, in addition to these parameters it is important to analyze the chemoresistance.

Cells with mutated P53, like melanoma cells, can upregulate the expression of ABC transporters (Tonigold et al. 2014) and stimulate the MDR1 promoter (Chin et al. 1992). In fact, several studies reported that wild-type and mutated P53 proteins may play a role in the regulation of several ABC transporters, such as ABCB1 (MDR1, P-gp) and ABCC1 (MRP1) (Chin et al. 1992; Nguyen et al. 1994; Wang e Beck, 1998).

The development of synthetic small compounds and the identification of natural products that inhibit ABC transporters-mediated drug efflux have been a conventional approaches used to revert the multidrug resistance phenotype, MDR (Wu et al., 2008). Frank et al. (2003) reported that the ABCB5 protein can effectively transport rhodamine outside the cell. Considering that the activity of drug-efflux transporters was inhibited, as observed in rhodamine-B assay ( $6 \times 10^{-2} \mu\text{M}$  at 24 h

and 48 h-exposure, 6x100  $\mu$ M at 24 h-exposure), there is strong evidence that TBP is able to inhibit the efflux system based in the ABCB5 transporter.

Additionally, B16F1 cells exposed to TBP had increased levels of ABCB5 mRNA transcripts (6x10<sup>0</sup>  $\mu$ M). The increases of ABCB5 transporters gene expression at 48 h-experiment could be a response to decreased efflux capacity of the cells and the suggested ABCB5 impairment observed in this study. Exposure to TBP caused significant increases of rhodamine retention in the 24 h-experiment. For the highest concentration of TBP, rhodamine retention increased only in the 24 h-experiment, since at 48 h-experiment there was an increase of the gene expression of ABCB5 transporters, which can transport rhodamine out of cells (Frank et al. 2003).

This result may have some relation with cell resistance, since high ABCB5 expression is a hallmark of the murine melanoma cells B16F10, the more metastatic and resistant counterpart of B16F cells (Ehira et al., 2010; Schatton et al., 2008). This is a very important finding, because Schatton et al. (2008) reported that primary and metastatic melanomas significantly express more ABCB5 than benign melanocytic cells, so that ABCB5 can be associated with neoplastic progression and chemotherapy-refractoriness of malignant melanoma. Indeed, ABCB5-expressing cells survive selectively when exposed to drugs used in the treatment against metastatic melanoma, such as dacarbazine, vemurafenib and several others.

Finally, these findings are of great importance because humans are in contact with a myriad of organic molecules through diet, water and air, and no study has been performed to investigate the role of pollutants in cancer prognosis.

### **Conflict of Interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### **Transparency Document**

The Transparency document associated with this article can be found in the online version.

### **Acknowledgements**

We appreciate Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco and Dr. Edvaldo da Silva Trindade for their collaboration with the project idea, and Dr. Silvio Sanches Veiga by

the contribution. This research was supported by CNPq (Brazilian Agency for Science and Technology) and CAPES (PhD scholarship).

## REFERENCES

Alexander, J., Benford, D., Boobis, A., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Cravedi, J.P., Domenico, A.D., Doerge, D., Dogliotti, E., Edler, L., Farmer, P., Filipič, M., Fink-Gremmels, J., Fürst, P., Guerin, T., Knutsen, H.K., Machala, M., Mutti, A., Rose, M., Schlatter, J., Leeuwen, R.V., 2012. scientific opinion on brominated flame retardants (BFRs) in food: brominated phenols and their derivatives. Panel on contaminants in the food chain. EFSA Journal 10, 2634-2676.  
(<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2634>)

Aznar-Alemany, Ò., Trabalón, L., Jacobs, S., Barbosa, V.L., Tejedor, M.F., Granby, K., Kwadijk, C., Cunha, S.C., Ferrari, F., Vandermeersch, G., Sioen, I., Verbeke, W., Vilavert, L., Domingo, J.L., Eljarrat, E., Barceló, D., 2017. Occurrence of halogenated flame retardants in commercial seafood species available in European markets. Food Chem. Toxicol. 6915, 30495-1.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28027981>)

Cantón, R.F., Sanderson, J.T., Letcher, R.J., Bergman, A., Berg, M.V.D 2005. Inhibition and induction of aromatase (cyp19) activity by brominated flame retardants in h295r human adrenocortical carcinoma cells. Toxicological Sciences 88, 447–455.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177243>)

Cantón, R.F., Sanderson, J.T., Nijmeijer, S., Bergman, A., Letcher, R.J., Berg, M.V.D, 2006. In vitro effects of brominated flame retardants and metabolites on CYP17 catalytic activity: A novel mechanism of action? Toxicology and Applied Pharmacology 216, 274–281.  
(<http://www.sciencedirect.com/sci-hub.cc/science/article/pii/S0041008X06001864>)

Chin, K.V., Ueda, K., Pastan, I., Gottesman, M.M., 1992. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. Science 255, 459–462.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1346476>)

Ehira, N., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Kondo, T., Asaka, M., Ehira, T.S., et al., 2010. An embryo-specific expressing TGF- $\beta$  family protein, growth-differentiation factor 3 (GDF3), augments progression of B16 melanoma. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 29, 135.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2972255/pdf/1756-9966-29-135.pdf>)

Epel, D., Luckenbach, T., Stevenson, C.N., Macmanus-Spencer, L.A., Hamdoun, A., Smital, T., 2008. Efflux Transporters: Newly Appreciated Roles in Protection against Pollutants: Cellular “bouncers” help keep toxicants out of cells, but anthropogenic chemicals can circumvent or overwhelm this defense. Environ Sci Technol. 42, 3914–3920.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3160781/>)

Ezechiáš, M., Svobodová, K., Cajthaml, 2012. Hormonal activities of new brominated flame retardants. *Chemosphere* 87, 820-824.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22236593>)

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 136, E359-E386.  
(<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.29210/abstract>)

Fields, R.D., Lancaster, M.V., 1993. Dual attribute continuous monitoring of cell proliferation cytotoxicity. *American Biotechnology Laboratory* 11, 48-50.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7763491>)

Frank, N.Y., Pendse, S.S., Lapchak, P.H., Margaryan, A., Shlain, D., Doeing, C., Sayegh, M.H., Frank, M.H., 2003. Regulation of Progenitor Cell Fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a Novel Human ATP-binding Cassette Transporter. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 47156–47165.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12960149>)

Franken, N.A.P., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., Bree, C.V., 2006. Clonogenic assay of cells *In vitro*. *Nature Protocols* 1, 2315 – 2319.  
(<http://www.nature.com/nprot/journal/v1/n5/full/nprot.2006.339.html>)

Fujii, Y., Nishimura, E., Kato, Y., Harada, K.H., Koizumi, A., Haraguchi, K., 2014. Dietary exposure to phenolic and methoxylated organohalogen contaminants in relation to their concentrations in breast milk and serum in Japan. *Environ. Int.* 63, 19-25.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24263137>)

Ghosh, M., Meerts, I.A.T.M., Cook, A., Bergman, A., Brouwerb, A., Johnsona, L.N., 2000. Structure of human transthyretin complexed with bromophenols: a new mode of binding. *Acta Cryst.* 56, 1085-1095.  
(<http://journals.iucr.org/sci-hub.cc/d/issues/2000/09/00/ad0111/ad0111sup1.pdf>)

Gutiérrez, M., Becerra, J., Godoy, J., Barra, R., 2005. Occupational and environmental exposure to tribromophenol used for wood surface protection in sawmills. *International Journal of Environmental Health Research* 15, 171-179.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16134480>)

Hamers, T., Kamstra, J.H., Sonneveld, E., Murk, A.J., 2006. *In Vitro* profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants. *Toxicol. Sci.* 92, 157-173.  
(<https://academic.oup.com/toxsci/article-lookup/doi/10.1093/toxsci/kfj187>)

Hovander, L., Malmberg, T., Athanasiadou, M., Athanassiadis, I., Rahm, S., Bergman, A., Wehler, E.K., 2002. Identification of hydroxylated PCB metabolites and other phenolic halogenated pollutants in human blood plasma. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 105-117. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11706375>)



IUCLID, 2003. Data set for 2,4,6-tribromophenol. Ispra, European Chemicals Bureau, International Uniform Chemical Information Database.  
(<http://www.oecd.org>)

Koch, C., Sures, B., 2018. Environmental concentrations and toxicology of 2,4,6-tribromophenol (TBP). *Environmental Pollution* 233, 706-13.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29126092>)

Kotterman, M., Van der Veen, I., Van Hesseligen, J., Leonards, P., Osinga, R., de Boer J., 2003. Preliminary study on the occurrence of brominated organic compounds in Dutch marine organisms. *Biomol. Eng.* 20, 425-7.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12919829>)

Kueng, W., Silber, E., Eppenberger, U., 1989. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical Biochemistry* 182, 16-19.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2604040>)

Lee, B.; Sandhu, S.; McArthur, G., 2015. Cell cycle control as a promising target in melanoma. *Curr. Opin. Oncol.*, 27, 141-50.  
(<http://journals.lww.com/sci-hub.cc/co-oncology/pages/articleviewer.aspx?year=2015&issue=03000&article=00011&type=abstract>)

Lee, D., Ahn, C., Hong, E.J., An, B.S., Hyun, S.H, Choi, K.C., Jeung, E.B., 2016. 2,4,6-Tribromophenol Interferes with the thyroid hormone system by regulating thyroid hormones and the responsible genes in mice. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 13, 697. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27420076>)

Leonetti, C., Butt, C.M., Hoffman, K., Miranda, M.L., Stapleton, H.M., 2016. Concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and 2,4,6-tribromophenol in human placental tissues. *Environ. Int.* 88, 23-29.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26700418>)

Liang, C.C., Park, A.Y., Guan, J.L., 2007. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nature Protocols* 2, 329-333.  
(<http://www.nature.com/nprot/journal/v2/n2/full/nprot.2007.30.html>)

Liebel, S., de Oliveira, R.C.A., de Magalhães, V.F., da Silva, R.C., Rossi, S.C., Randi, M.A., Filipak Neto, F., 2015. Low concentrations of cylindrospermopsin induce increases of reactive oxygen species levels, metabolism and proliferation in human hepatoma cells (HepG2). *Toxicol In Vitro.* 29, 479-488.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25575781>)

Liu, M., Zhang, W., Wei, J., Qiu, L., Lin, X., 2012. Marine bromophenol bis(2,3-dibromo-4,5-dihydroxybenzyl) ether, induces mitochondrial apoptosis in K562 cells and inhibits topoisomerase I *in vitro*. *Toxicol. Lett.* 211, 126-34.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22484147>)

Liu, M., Wang, G., Xiao, L., Xu, X., Liu, X., Xu, P., Lin, X., 2014. Bis(2,3-dibromo-4,5-dihydroxybenzyl) Ether, a Marine Algae Derived Bromophenol, Inhibits the Growth of *Botrytis cinerea* and Interacts with DNA Molecules. *Mar. Drugs* 12, 3838-3851. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4113801/pdf/marinedrugs-12-03838.pdf>)

Lo, J.A., Fisher, D.E., 2014. The melanoma revolution: From UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science* 346, 945-949. (<http://sci-hub.cc/http://science.sciencemag.org/content/346/6212/945.full>)

Machana, S., Weerapreeyakul, N., Barusrux, S., Nonpunya, A., Sripanidkulchai, B., Thitimetharoch, T., 2011. Cytotoxic and apoptotic effects of six herbal plants against the human hepatocarcinoma (HepG2) cell line. *Chinese Medicine* 6, 39. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22041055>)

Mardones, C., Baer, D.V., Silva, J., Retamal, M.J., 2008. Determination of halophenolic wood preservative traces in milk using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 1215, 1-7. (<http://www.sciencedirect.com/sci-hub.cc/science/article/pii/S0021967308018864>)

Nguyen, K.T., Liu, B., Ueda, K., Gottesman, M.M., Pastan, I., Chin, K.V., 1994. Transactivation of the human multidrug resistance (MDR1) gene promoter by p53 mutants. *Oncol. Res.* 6, 71-77. (<http://www.ingentaconnect.com/contentone/cog/or/1994/00000006/00000002/art00005>)

Olsen, C.M., Meussen-Elholm, E.T., Holme, J.A., Hongslo, J.K., 2002. Brominated phenols: characterization of estrogen-like activity in the human breast cancer cell-line MCF-7. *Toxicol. Lett.* 129, 55-63. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11879974>)

Patel, H.D., Zaveri, A.D., Zaveri, D.N., Shah, S., Solanki, A., 2013. Comparison of the mtt and alamar blue assay for in vitro anti-cancer activity by testing of various chalcone and thiosemicarbazone derivatives. *Int J Pharm Bio Sci.* 4, 707-716. ([https://www.researchgate.net/publication/282075048\\_Comparison\\_of\\_the\\_mtt\\_and\\_alamar\\_blue\\_assay\\_for\\_in\\_vitro\\_anti\\_cancer\\_activity\\_by\\_testing\\_of\\_various\\_chalcone\\_and\\_thiosemicarbazone\\_derivatives](https://www.researchgate.net/publication/282075048_Comparison_of_the_mtt_and_alamar_blue_assay_for_in_vitro_anti_cancer_activity_by_testing_of_various_chalcone_and_thiosemicarbazone_derivatives))

Payne, J., Scholze, M., Kortenkamp, A., 2001. Mixtures of Four Organochlorines Enhance Human Breast Cancer Cell Proliferation. *Environmental Health Perspectives* 109, 391-397. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1240280/pdf/ehp0109-000391.pdf>)

Poskus, L.T., Lima, R.S.M.S., Lima, I.R., Guimarães, J.G.A., Silva, E.M., Granjeiro, J.M.G., 2009. Cytotoxicity of current adhesive systems: *in Vitro* testing on cell culture of L929 and Balb/C 3T3 fibroblasts. *Rev. Odonto Ciênc.* 24, 129-134. (<file:///C:/Users/Yvanna/Downloads/4838-17939-1-PB.pdf>)

Pullen, S., Boecker, R., Tiegs, G., 2003. The flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrabromobisphenol A/bisallylether suppress the induction of interleukin-2 receptor a chain (CD25) in murine splenocytes. *Toxicology* 184, 11-22. (<http://www.sciencedirect.com/sci-hub.cc/science/article/pii/S0300483X02004420>)

Riker, A.I., Zea, N., Trinh, T., 2010. The Epidemiology, Prevention, and Detection of Melanoma. *The Ochsner Journal* 10, 56–65. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3096196/pdf/i1524-5012-10-2-56.pdf>)

Schatton, T., Murphy, G.F., Frank, N.Y., Yamaura, K., Waaga-Gasser, A.M., Gasser, M., Zhan, Q., Jordan, S., Duncan, L.M., Weishaupt, C., Fuhlbrigge, R.C., Kupper, T.S., Sayegh, M.H., Frank, M.H., 2008. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 451, 345–349. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18202660?dopt=Abstract&holding=npg>)

Shi, D., Li, J., Guo, S., Su, H., Fan, X., 2009. The antitumor effect of bromophenol derivatives in vitro and Leathesia nana extract in vivo. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 27, 277–282. (<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00343-009-9119-x>)

Stapleton, H.M., Eagle, S., Anthopolos, R., Wolkin, A., Miranda, M.L., 2011. Associations between polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants, phenolic metabolites, and thyroid hormones during pregnancy *Environ. Health Perspect.* 119, 1454-1459. (<https://ehp.niehs.nih.gov/1003235/>)

Thomsen, C, Lundanes E, Becher, G., 2002. Brominated flame retardants in archived serum samples from Norway: a study on temporal trends and the role of age. *Environ. Sci.. Technol.* 36, 1414-1418. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/secure.sci-hub.cc/pubmed/11999045?dopt=Abstract>)

Tonigold, M., Rossmann, A., Meinold, M., Bette, M., Märken, M., Henkenius, K., Bretz, A.C., Giel, G., Cai, C., Rodepeter, F.R., Beneš, V., Grénman, R., Carey, T.E., Lage, H., Stiewe, T., Neubauer, A., Werner, J.A., Brendel, C., 2014. A cisplatin-resistant head and neck cancer cell line with cytoplasmic p53mut exhibits ATP-binding cassette transporter upregulation and high glutathione levels. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* (<http://link.springer.com/secure.sci-hub.cc/article/10.1007%2Fs00432-014-1727-y>)

Yamada, T., Takahama, Y., Yamada, Y., 2008. Biodegradation of 2,4,6-Tribromophenol by *Ochrobactrum* sp. Strain TB01. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 72, 1264–1271. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18460800>)

Wang, Q.J., Beck, W.T., 1998. Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wildtype p53. *Cancer Res.* 58, 5762–5769. (<http://cancerres.aacrjournals.org/content/58/24/5762.long>)

WHO, 2005. International Health Regulations. World Health Organization, 2.

([http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/cicad\\_66\\_web\\_version.pdf](http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/cicad_66_web_version.pdf))

Wu, C.P., Calcagno, A.M., Ambudkar, S.V., 2008. Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: Evaluation of current strategies. *Curr. Mol. Pharmacol.* 1, 93–105.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2600768/pdf/nihms44089.pdf>).

Wu, N., Luo, M.J., Jiang, B., Wang, L., Wang, S., Wang, C., Fu, C., Li, J., Shi, D., 2015. Marine bromophenol bis (2,3-dibromo-4,5-dihydroxy-phenyl)-methane inhibits the proliferation, migration, and invasion of hepatocellular carcinoma cells via modulating  $\beta$ 1-integrin/FAK signaling. *Mar. Drugs.* 13, 1010-25.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25689564>)

## **CAPÍTULO II**

**Isolated agrochemicals, metabolites and mixtures affect the  
phenotype of murine melanoma B16F1 cells**

Submetida à Food and Chemical Toxicology (Qualis A2)

## **Isolated agrochemicals, metabolites and mixtures affect the phenotype of murine melanoma B16F1 cells**

Yvanna Carla de S. Salgado<sup>a\*</sup>, Marianna Boia Ferreira<sup>a</sup>, Jessica Zablocki da Luz<sup>a</sup>, Francisco Filipak Neto<sup>a</sup>, Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Cx. Postal 19031, CEP 81.531-990, Curitiba, PR, Brazil.

\*Corresponding authors:  
Yvanna C S Salgado  
yvannacarla@hotmail.com  
Ciro A Oliveira Ribeiro  
ciro@ufpr.br  
Tel: +55 (41) 3361-1680.

### **ABSTRACT**

Melanoma is responsible for about 90% of skin cancer mortality. Carcinogenesis involves inherited and environmental risk factors triggered by physical, biological and chemical agents. Chemicals present in the environment, such as pesticides and their mixtures, can directly interact with non-tumor and tumor cells by different mechanisms and modulate their phenotype. The aim of the current study was to investigate the cellular responses of B16F1 murine melanoma cells after exposure to lone and mixtures of the agrochemicals atrazine, desethylatrazine, carbaryl, 1-naphthol, glyphosate and aminomethylphosphonic acid (Ampa). The effects on cell viability/number (neutral red, MTT, crystal violet and PI/Anexin V assays) were generally low (<10%), except for high concentrations and some mixtures. Conversely, decreases of >20% on the number of cell colonies and the multidrug resistance activity (rhodamine B retention) and increases of the levels of ABCB5 mRNAs (>460%) were more pronounced. Foremost, increased viability/cell number, ABCB5 mRNAs and drug efflux transporters activity, are very important, since some changes on cell phenotype could render melanoma cells even more unresponsive to chemotherapy. In addition, the effects occurred even at concentrations below the acceptable daily intake available from regulatory agency.

**Keywords:** pesticides, metabolites, melanoma, in vitro, ABC transporter, ABCB5.



## 1. INTRODUCTION

Melanoma has an increasing global incidence, especially among Caucasians, and advanced stages of the disease has unfavorable prognosis due to cell's drug resistance (Kalal *et al.*, 2017). About 90% of the human mortality from skin cancer is caused by melanoma, and the World Health Organization estimates more than 65,000 deaths by melanoma per year worldwide. Melanoma presents low responsiveness to available treatments, with 5-year survival rate lower than 5% of patients (Kalal *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2017; Lacina *et al.*, 2017).

Carcinogenesis is a complex process involving inherited and environmental risk factors, triggered by physical, biological and chemical agents. The number of ways in which the chemical agents contribute to carcinogenesis may be extensive if all biochemical and molecular endpoints are considered (Maru *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2016). Several cell resistance mechanisms have been described, but increased drug efflux is the most common in cancer cells. The ATP-binding cassette transporters (ABC transporters) superfamily presents an important role on the efflux of various chemotherapeutic drugs (Szakacs *et al.*, 2006; Fletcher *et al.*, 2010), modulating the overall sensitivity of B16F1 cells.

Several human activities increase the environmental release of harmful substances and toxins that are capable of acting as tumor inducers or promoters (Gammon; Santella, 2008; Rusyn; Corton, 2012). In general, pesticides and agrochemicals have become an important component of the world's agricultural systems over the last century, allowing a remarkable increase of crop yields and food production. But residues of various agrochemicals can persist in the soil, water and food, so that human populations may be chronically exposed to these chemicals. Chronic exposure to certain agrochemicals can increase the incidence of cancer in humans (IARC, 2013; Carvalho, 2017).

Pesticides present in the environment can interact with each other and with cells by different mechanisms, leading to effects that can differ from the additive predictions. On this way, the identification of biological and molecular responses involved with pesticide mixtures are novel and difficult the interpretation. Despite of that, this approach is more realistic assessing the occurrence of interactive effects that cause unpredictable responses (Hernández *et al.*, 2017).

Studies with human populations directly exposed to agrochemicals reported an increased risk of developing melanoma and other skin cancers, although the exposure to the sun should also be considered (Dennis *et al.*, 2010). However, data on the influence of pollutants on the prognosis of cancer are still not available.

In the current study, we investigated the responses of murine melanoma B16F1 cells after exposure to agrochemicals of commercial and environmental importance through endpoints of cytotoxicity, cell migration, cycle and death, morphology and chemoresistance (drug efflux transporters activity). Three widely used agrochemicals in Brazil (atrazine, carbaryl and glyphosate) and their main metabolites (desethylatrazine, 1-Naphthol and aminomethylphosphonic acid) were selected. Atrazine is an herbicide of class III toxicological classification of ANVISA (Brazilian Health Regulatory Agency) (Weber *et al.*, 2013). Carbaryl is an insecticide that belongs to the chemical group of naphthyl methylcarbamate (class II - ANVISA) and is among the most used classes of pesticides in Brazil. Glyphosate is an herbicide that belongs to the chemical group of substituted glycine (class IV - ANVISA) (ANVISA, 2017). According to Hernández *et al.* (2017) two approaches can be used to assess the toxicity of chemical mixtures: testing the whole mixture (top-down approach) and testing the individual components of the mixture (bottom-up approach). Here, the effects of isolated agrochemicals and metabolites as well as their mixtures were investigated. B16F1 cells were selected because they are less metastatic and chemoresistant than the B16F10 cells (Ehira *et al.*, 2010), so that changes of the malignancy can be easily identified.

## 2. METHODS

### 2.1 EXPERIMENTAL DESIGN

The agrochemicals were purchased from Sigma Aldrich (>99% purity). Stock solution of glyphosate (GLI) and aminomethylphosphonic acid (Ampa) were prepared in water and kept at -20 °C. Stock solutions of desethylatrazine (Datz), atrazine (Atz), carbaryl (Carb), 1-Naphthol (Naft), were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and kept at -20 °C. The dilutions and mixtures of three agrochemicals (3-Pol=Gli+Atz+Carb), the three metabolites (3-Met=Ampa+Datz+Naft) and the six agrochemicals (6-Pol= Atz+Carb+Ampa+Datz+Naft), were prepared at the time of

exposure in culture medium with final concentration of 0.05% dimethylsulfoxide (Table 1).

Murine melanoma B16F1 cells (Rio de Janeiro Cell Bank, Brazil) were cultured in high glucose DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 40 mg.l<sup>-1</sup> of gentamicin sulfate at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. For the experiments, the cells were initially cultured for 24 h (for attachment) and then exposed to five concentrations of the agrochemicals in culture medium for 24 and 48 h, with a control group kept in parallel. Data from acceptable daily intake, available from the Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA), was used to select an intermediate concentration (Table 1). Then, a 10-, 100- and 1000-fold lower (low) concentration and a 10- and 100-fold higher (high) concentration were established. The final DMSO concentration in culture medium of all groups was 0.05%.

**Table 1.** Experimental groups

Agrochemicals	Abbreviation	Concentration [μM]
Atrazine	Atz1	1.4x10 <sup>-4</sup>
	Atz2	1.4x10 <sup>-3</sup>
	Atz3	1.4x10 <sup>-2</sup>
	<b>Atz4</b>	<b>1.4x10<sup>-1</sup></b>
	Atz5	1.4x10 <sup>0</sup>
	Atz6	1.4x10 <sup>1</sup>
Desethylatrazine	Datz4	1.6x10 <sup>-1</sup>
Carbaryl	Carb4	1.5x10 <sup>-2</sup>
1-Naphthol	Naph4	2.1x10 <sup>-2</sup>
Glyphosate	Gly4	2.5x10 <sup>-1</sup>
Aminomethylphosphonic acid	Ampa4	3.8x10 <sup>-1</sup>
Atz+Carb+Gly+Datz+Naph+Ampa	6-Pol3 / 6-Pol5	Concentration 3 or 5
Gly+Atz+Carb	3-Pol3 / 3-Pol5	Concentration 3 or 5
Ampa+Datz+Naph	3-Met3 / 3-Met5	Concentration 3 or 5

Notes: Concentration 4 (e.g., Atz4) refers to the intermediate concentration of agrochemicals based on acceptable daily intake from National Sanitary Surveillance Agency for all the agrochemicals (ANVISA, Brazil). From the concentration 4, higher (C5: 10x and C6: 100x) and lower (C3: 10x, C2: 100x and C1: 1000x) concentrations of agrochemicals and metabolites were established, as exemplified for atrazine. For the mixtures, only concentrations 3 or 5 of individual agrochemicals and metabolites were mixed.

## 2.2 CYTOTOXICITY OF ISOLATED AGROCHEMICALS

The cells were seeded onto 96-well microplates  $2 \times 10^3$  cells/well (24 h and 48 h-exposures) and  $5 \times 10^3$  cells/well (for Violet Cristal 2% FBS – 24h-exposure) and exposed for 24 and 48 h to the agrochemicals. Then, neutral red retention (incubation:  $40 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  neutral red for 2 h; reading: 540 nm), MTT metabolism (incubation:  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide for 1 h; reading: 560 nm) and violet crystal (staining: 0.2% crystal violet for 15 min; reading: 570 nm) assays were performed, according to the protocols of Borenfreud *et al.* (1987), Machana *et al.* (2011), Mosmann (1983), Poskus (2009), and Kueng *et al.* (1989).

## 2.3 CYTOTOXICITY OF ISOLATED AGROCHEMICALS AND THE MIXTURES

After the establishment of the intermediate concentration, mixtures of the 10-fold lower and the 10-fold higher concentration of each agrochemical and metabolite were prepared (Table 1). These mixtures contained the three agrochemicals and their respective metabolites (6-Pol), the three parental agrochemicals (3-Pol), and the three metabolites (3-Met).

The cells were exposed to the agrochemicals and their mixtures for 24 and 48 h. Then, neutral red retention, MTT metabolism and violet crystal assays were performed. In addition, Alamar blue<sup>®</sup> assay was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, 20  $\mu\text{l}$  of Alamar Blue<sup>®</sup> was added to each well of the 96-well microplate, and the absorbance was measured at 0.5, 2, 4, 6, 24, 48 and 72 h at 570 nm and 600 nm (Fields, Lancaster, 1993).

## 2.4 MULTIDRUG RESISTANCE

### 2.4.1 Activity

The cells were plated onto 96-well microplates ( $2 \times 10^3$  cells/well) and incubated with rhodamine B ( $1.0 \mu\text{M}$ , 30 min,  $37^\circ \text{C}$ ), washed, resuspended with PBS, frozen at  $-76^\circ \text{C}$ , thawed and transferred to black microplates for quantification of fluorescence (Ex. 485 nm, Em. 530 nm). For positive control, some cells were treated with

verapamil (20-60  $\mu$ M) for 24 h prior to incubation with rhodamine B (Cornwall *et al.*, 1995; Pessatti *et al.*, 2002; Liebel *et al.*, 2015).

#### 2.4.2 qPCR for ABCB5

The cells were plated onto 96-well microplates and the total RNA was extracted from the cells using TRIzol<sup>®</sup> (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. The RNA concentrations were measured with the NanoVue Plus spectrophotometer (GE Healthcare) and 10  $\mu$ g of total RNA was used. Real-time PCR was performed using the Power SYBR<sup>®</sup> Green RNA-to-CT 1-Step Kit (Applied Biosystems). Primers for ABCB5 transporter (sense 5'-GTGGCTGAAGAAGCCTTGTC-3', anti-sense 5'-TGAAGCCGTAGCCCTCTTTA-3') were obtained from Ehira *et al.* (2010). The relative quantification value for the target gene was compared with the endogenous control ( $\beta$ -actin), which was expressed as 2-(Ct-Cc) (Ct and Cc are the mean threshold cycle differences after normalizing to  $\beta$ -actin).

### 2.5 CELL RESPONSES

#### 2.5.1 Reactive oxygen species (ROS)

The cells plated onto 96-well microplates ( $2 \times 10^3$  cells/well) were incubated with 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (10  $\mu$ M, 15 min, 37  $^{\circ}$ C), washed and resuspended with PBS for fluorescence quantification (Ex. 488 nm, Em. 530 nm) (Liebel *et al.* 2015).

#### 2.5.2 P53

A q-PCR was performed for P53, as described for ABCB5 (subheading 3.4), using the following primers for P53 (sense 5'-GTCACAGCACATGACGGAGG-3'; anti-sense 5'-TCTTCCAGATGCTCGGGATAC-3') and (sense 5'-3'; anti-sense 5'-3') obtained from Primer Bank.

### 2.5.3 Cell cycle and death assays

The cells were plated onto 24-well plates ( $2.5 \times 10^5$  and  $1.25 \times 10^5$  cells/well, for 24 and 48 h-exposure, to cell cycle assay; and  $1.25 \times 10^5$  cells/well, 24 and 48 h-exposure, for cell death assay), and cultured for 12 h in FBS-supplemented medium followed by 12 h in FBS-free culture medium, at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Then, the cells were exposed to the agrochemicals for 24 and 48 h in 10% FBS-medium. For the assays, the cells were trypsinized (0.25% trypsin, 0.02% EDTA), washed and incubated with either propidium iodide/RNase (BD Pharmingen™ PI/RNase kit, BD Biosciences) for cell cycle or FITC-Annexin V/propidium iodide (PI) (Apoptosis Detection Kit, BD Biosciences) for cell death assay. Data acquisition (>10,000 events/replicate) was performed in the BD FACSCalibur flow cytometer (Pichichero *et al.*, 2010).

### 2.5.4 Scratch and clonogenic assays

For the scratch assay the cells were seeded onto 96-well plates ( $5 \times 10^4$  cells/well) and, upon reaching 90% confluency, the culture medium was replaced by FBS-free medium. After 10 h, 10 µM of mitomycin were added and the cells were cultured for 2 h. Then, a scratch was performed in the middle of each well of the microplate with a 10 µl-pipette tip. The suspended cells were removed, the culture medium was replaced by culture medium containing the agrochemicals, and the cells were cultured for up to 48 h. Images of the scratch were captured after 0, 24 and 48 h under inverted microscope (40x objective). After 48 h-exposure, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min at 4 °C and stained with Rosenfeld dye (Liang *et al.*, 2007). The area of scratches were measured at 0 and 48 h using the imageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) and the percentage of scratch closure were calculated.

For the clonogenic assay, 250 cells were plated onto 24-well plates and cultured for 12 h in FBS-supplemented medium followed by 20 h in FBS-free culture medium, at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. The cells were exposed to the agrochemicals for 24 and 48 h in culture medium supplemented with FBS, and maintained thereafter in medium containing FBS but not the agrochemicals. Culture medium was replaced at 3rd day post-exposure, and on the 5th day the cells were fixed in 4%

paraformaldehyde for 30 min at 4 °C and stained with Rosenfeld stain. The colonies were manually counted under naked eye (Franken *et al.*, 2006).

#### 2.5.5 Ultrastructure procedures

For ultrastructure investigation, cells B16F1 were cultivated and exposed to chemicals into 75 cm<sup>2</sup>-flask for 24 hours, mechanically removed and centrifuged in 2ml vials to form a cells pellet. The pellet was chemically preserved in a fixative solution (glutaraldehyde 2.5%, sodium cacodilic acid buffer - CaCo 0.1M, pH 7.2 - 7.4) for 1 hour at room temperature. After washed with CaCo 0.1 M buffer the pellets were post fixed in 1% osmium tetroxide (Electron Microscopy Science<sup>®</sup>), in 0.1 M cacodylate buffer solution (pH 7.2 - 7.4) for 1 h, dehydrated in a graded series of ethanol (Merck<sup>®</sup>), propylene oxide (Electron Microscopy Science<sup>®</sup>) and embedded in PoliEmbed 812 DER736 resin (Polysciences<sup>®</sup>). The ultra-thin sections (70 nm) were contrasted by uranyl acetate (5%) (Electron Microscopy Science<sup>®</sup>) for 20 minutes and lead citrate (Electron Microscopy Science<sup>®</sup>) for five minutes, and observed in a JEOL TEM 1200 EXII. The analysis was performed in the Center of Electron Microscopy at Federal University of Parana.

#### 2.6 STATISTICAL PROCEDURES

Three independent experiments were performed for all the endpoints. The number of replicates per experiment was: 5 replicates for MTT, neutral red, violet crystal and drug-efflux transport assays; 3 replicates for ROS, scratch, qPCR and for clonogenic assays and 2 replicates for Alamar blue<sup>®</sup>, cell cycle and cell death assays. The data were evaluated for normality, and one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison tests were performed. A value of  $p < 0.05$  was assumed as statistically significant.



### 3. RESULTS

#### 3.1 CYTOTOXICITY OF ISOLATED AGROCHEMICALS

Initially, a screening with six concentrations of agrochemicals and related metabolites was performed for selection of two test concentrations for further investigation. Increases of neutral red (NR) retention were observed after exposure to Atz6 (48 h: 7%), Datz5-6 (24 h: 20-28%, fig 1A), Naph5,6 (24 h: 22-33%; fig 1B) and Ampa6 (48 h: 16%, fig 1C). Decreases of NR retention occurred for Atz1 (48 h: 9%, fig 1A) and Ampa (24 h: 20-23% for Ampa1-3; 48 h: 14% for Ampa1-2, fig 1C).

MTT metabolism increased for Atz1 (48 h: 6%, fig 1A), Datz (24 h: 18% for Datz6; 48 h: 7-11% for Datz4-6, fig 1A), Carb (24 h: 7% for Carb4,5; 48 h: 3-5% for Carb4-6; fig 1B) and Gly1-2 (48 h: 5-8%, fig 1C). Slight decreases (5-8%) of MTT metabolism occurred for Atz3 (24 h), Naph (24 h: Naph1-4; 48 h: Naph3-4; fig 1A-B) and Ampa2-5 (24h: 8-13%).

There was a slight decreased (6-10%) of the number of attached cells for Datz6 (48 h, fig 1A), Carb (24 h: Carb6; 48 h: Carb2,3,6), Naph6 (48 h, fig 1B), Ampa (24 h: Ampa5; 48 h: Ampa1), as well as a slight increase for Ampa3 (24 h: 6%, fig 1C).

#### 3.2 CYTOTOXICITY OF ISOLATED AGROCHEMICALS AND THE MIXTURES

Decreases of NR retention occurred for all mixtures (11-19%) except for 6-pol3 at 24 h-exposure. Conversely, NR retention was not affected for the mixtures at 48 h-exposure, except for 6-pol3 (decrease of 21%; fig 2A). MTT metabolism decreased for 6-pol5 (13%) and 3-pol3 (4%) at 24 h-exposure and 6-pol5 (4%) after 48 h of exposure. The number of attached cells decreased for 6-pol3 (10%) after 24 h-exposure, and 6-pol3 (14%) and 6-pol5 (4%), 3-pol3 (4%, fig 2A) when cells were exposed in the presence of 10% FBS. To reduce the mitogenic effect of mitogens on cell proliferation, the concentration of FBS was reduced for 2%. At 2% FBS, the number of attached cells decreased for Atz3,5 (5-7%), Ampa5 (7%), 6-pol3 (13%), 3-pol3 (7%), 3-Met3 (6%) after 24 h-exposure (fig 1E).

The exposure to agrochemicals, metabolites and mixtures led to an increase of mitochondrial metabolic activity (Alamar Blue<sup>®</sup> assay) at 2 h, and this increase persisted for Ampa5 (4-8%, 6 and 24 h), 6-pol3 (4-9%, 6-72 h; fig. 1D).

### 3.3 MULTIDRUG RESISTANCE:

All agrochemicals, metabolites and mixtures caused decreases of the activity of drug-efflux transporters (measured as increases of the intracellular concentration of rhodamine B), particularly for 24 h-experiment: Atz3,5 (111-138%), Datz3 (85%), Carb3,5 (74-141%), Naph3,5 (78-85%), Gly3,5 (53-58%), Ampa3,5 (101-109%), 6-Pol3,5 (54%-82%), 3-Pol3,5 (82-86%), 3-Met3,5 (62-84%). This increase persisted for Atz (Atz3: 74%; Atz5: 29%), 6-Pol3 (26%) after 48 h-exposure, but not for the other agrochemicals (fig 2A). For the positive control (60  $\mu$ M verapamil) the intracellular concentration of rhodamine B in increased  $\approx$  98% after 24 h-exposure, and  $\approx$  40% after 48 h-exposure.

The levels of mRNA for ABCB5, a member of membrane ABC transporters, increased for Naph3: (24 h: 467%) and 3-Met3 (24 h: 3911%; fig 2B).

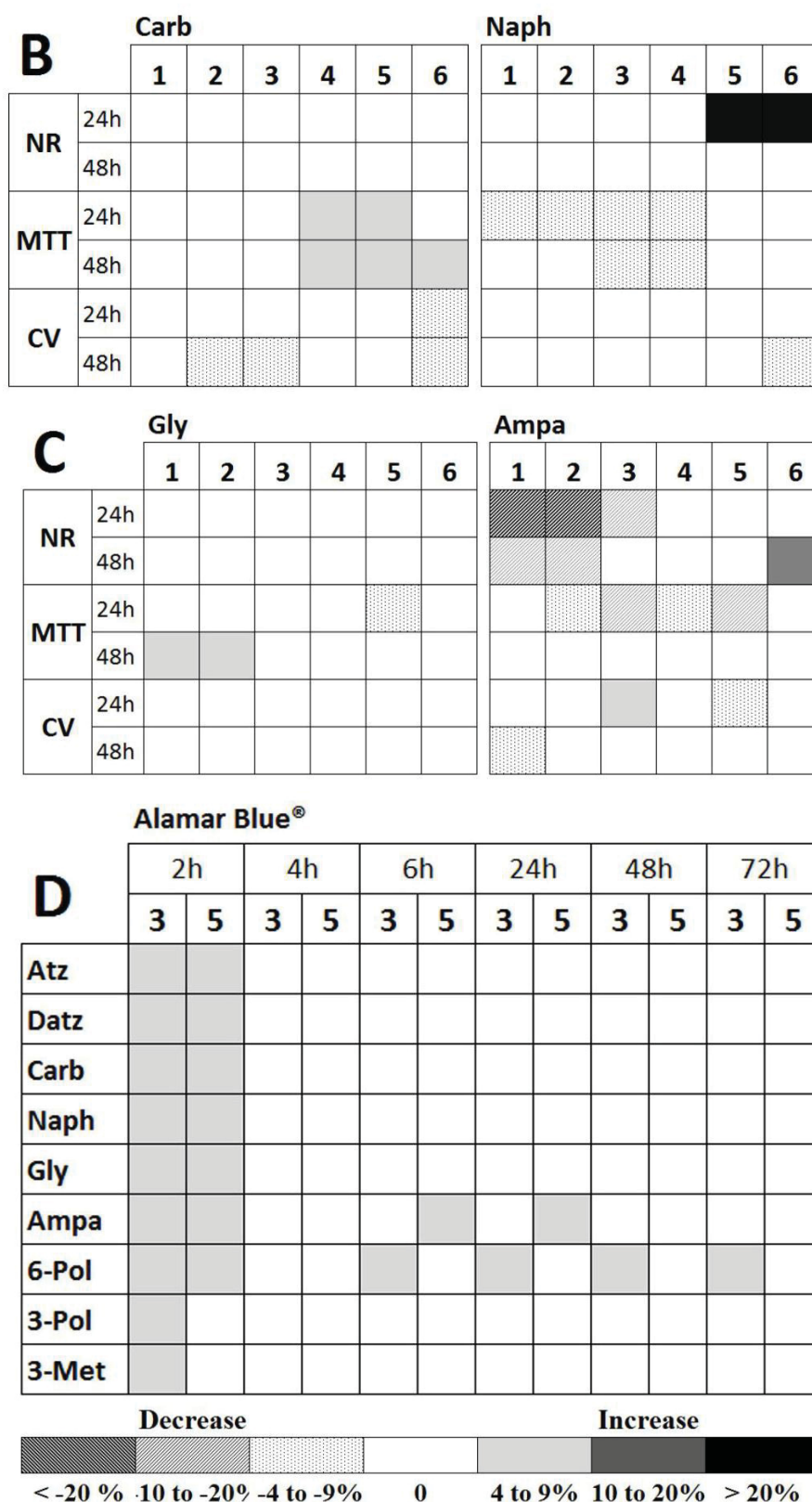
### 3.4 CELL RESPONSES:

As very low concentrations of the agrochemicals showed significant results, the concentration 3 was selected for the subsequent tests. Alterations on reactive oxygen species levels (Datz3: 141%; Naph3: 178%; fig 2B) and percentage of cells in S phase (Datz3: 10%; Ampa3: 5%), G1 phase (3-Pol3 and 6-Pol3: 3%) and G2/M phase (6-Pol3: 6%, fig 3A) of cell cycle at 24 h-exposure, but not on cytoplasmic P53 mRNA levels (fig. 2B).

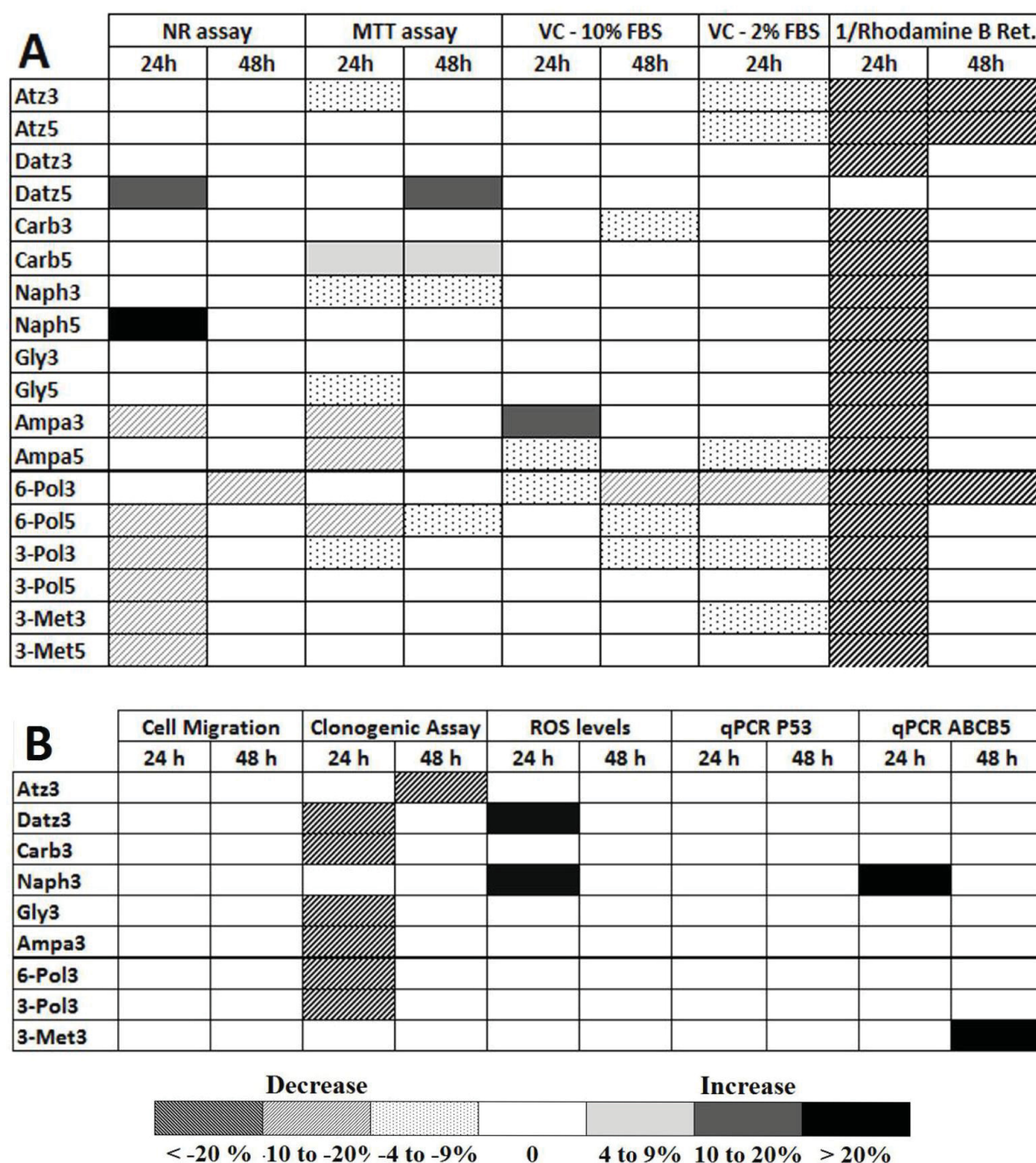
Slight increases of viable cells were observed in the cell death assay for 3-Pol3 and 6-Pol3 (8-9%) after 24 h-exposure, and for Atz3, Datz3, Carb3, Naph3, Ampa3, 3-Pol3 and 6-Pol3 and 3-Met3 (3-4%) after 48 h-exposure (fig 3B). Consequently, there were a decrease of the basal percentage (control levels) of cells in late apoptosis + necrosis for 6-Pol3 (32%) and in initial apoptosis for 3-Pol3 (84%) after 24 h-exposure; and a decrease in late apoptosis + necrosis cells of 28-34% for Atz3, Datz3, Carb3, Naph3 and Ampa3, and of 37-47% for 3-Pol3, 6-Pol3 and 3-Met3 after 48 h-exposure (fig 3B).

The groups DMSO and DMSO free did not presented significant differences, and so both control groups were analyzed together (fig. 4A). Comparatively among the tested agrochemicals groups after isolate exposure, the glyphosate was the most toxic leading to severe damages in B16F1 (fig. 4B). Cells exposed to atrazine showed nuclear and cytoplasm alterations, but these damages are more accentuated in cells exposed to the original molecule than for its metabolite desethylatrazine. In general the results showed that cells exposed to metabolites are less toxic when compared with its parental molecules. Also is observed that some metabolites are more toxic than other non-parental chemicals, as described to 1-naphtol, a metabolite of carbaryl (fig. 4C). In these cells a vacuolization within cytoplasm is more frequent and showed more severe damages. The effects of mixtures were more accentuated if compared with isolated exposures. Necrosis cell death was frequent in cells exposed to parental mixture (fig. 4D) while nuclear and membrane integrity were evident and more observed in cells exposed to a mixtures of metabolites (fig. 4E). When all chemicals were grouped in a only mixture the results showed a more accentuated events on nuclei morphology (fig. 4F).

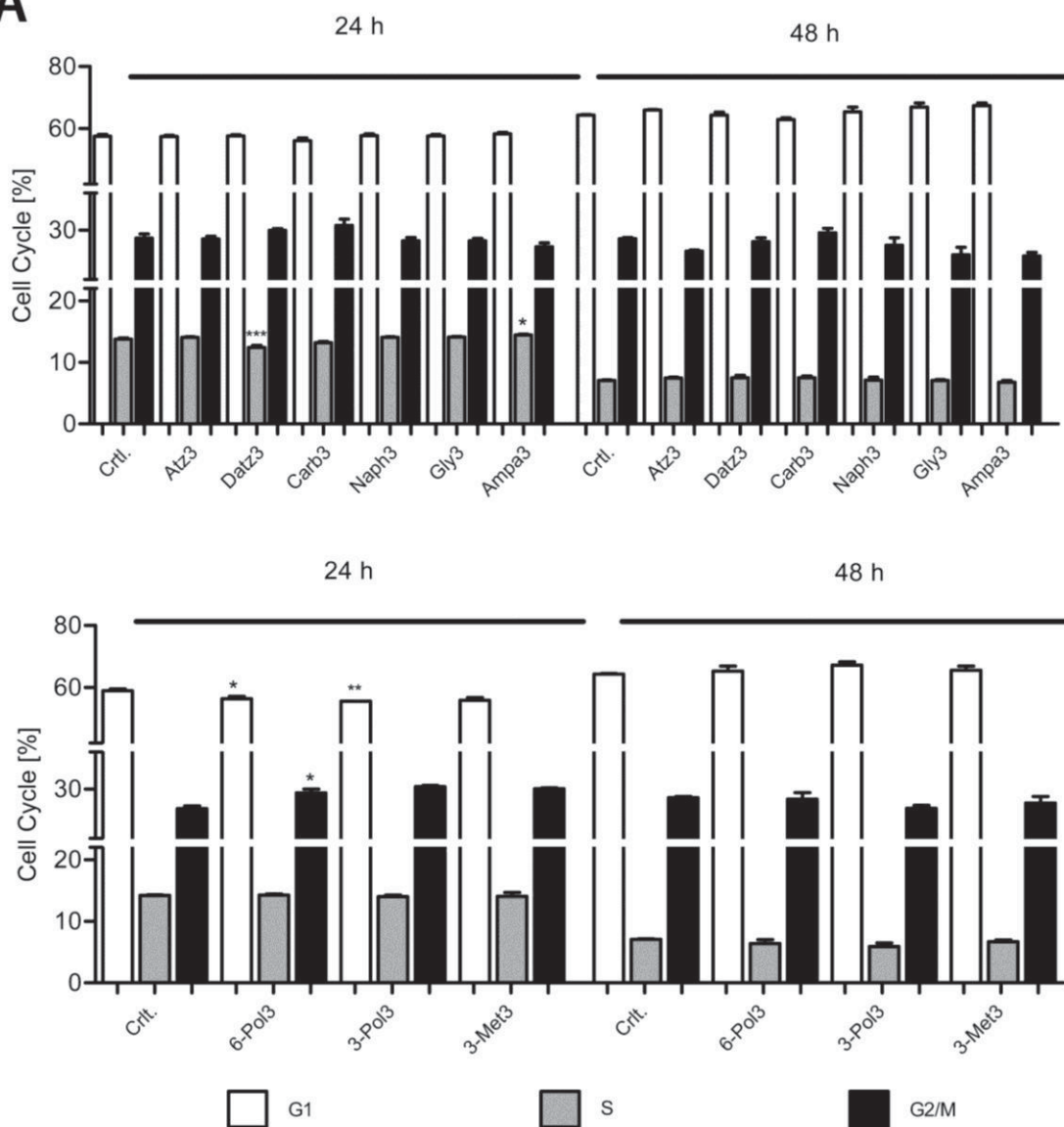
		Atz						Datz					
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
<b>NR</b>	24h												
	48h												
<b>MTT</b>	24h												
	48h												
<b>CV</b>	24h												
	48h												



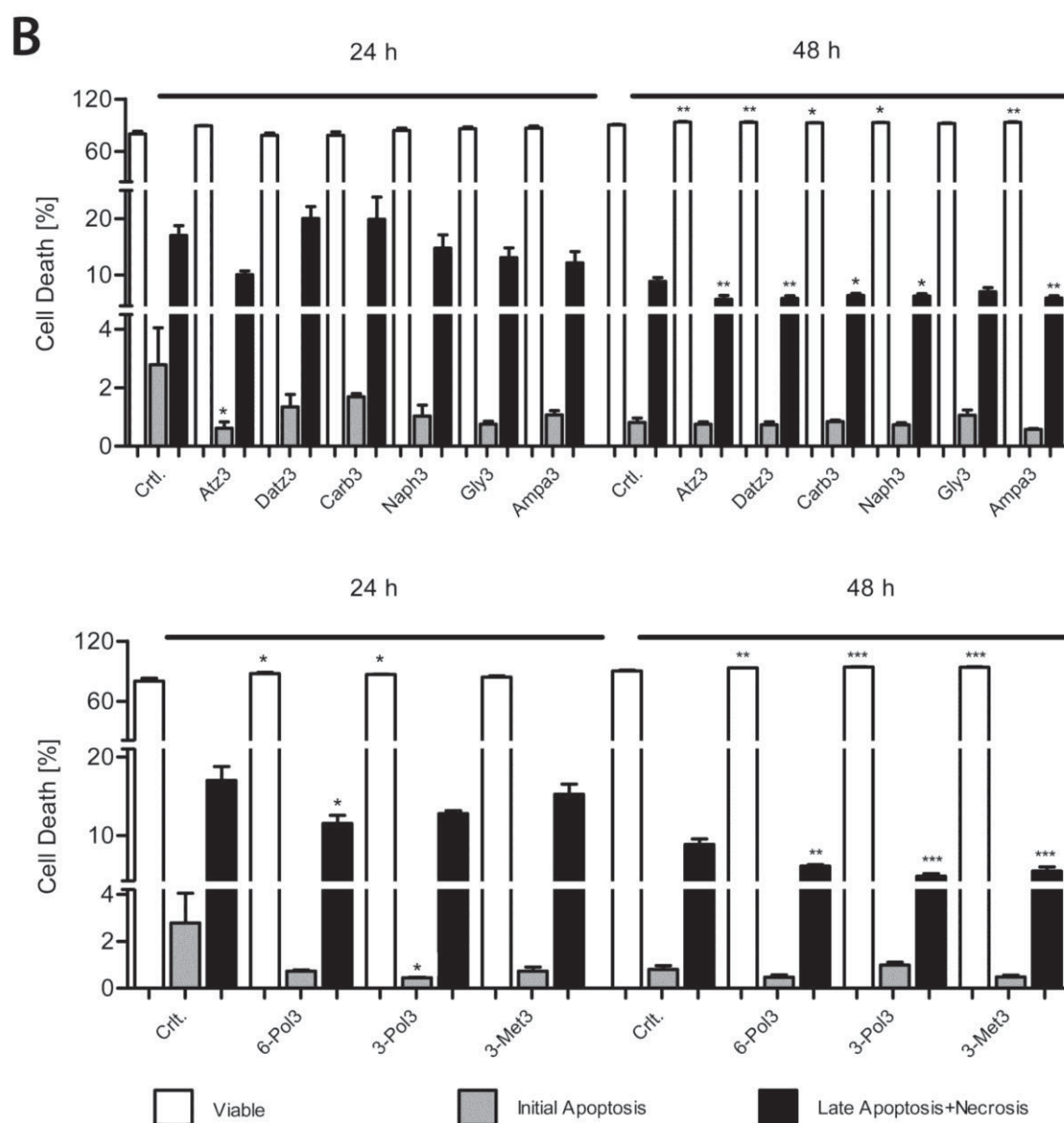
**Figure 1.** Cytotoxicity of the agrochemicals to B16F1 cells. Neutral red (NR), MTT, crystal violet (CV) and Alamar Blue® assays. Concentrations 1 to 6 are arranged at 10-fold steps (table 1). Agrochemicals and their metabolites: atrazine (Atz) and desethylatrazine (Datz), carbaryl (Carb) and 1-naphtol (Naph), and glyphosate (Gly) and aminomethylphosphonic acid (Ampa). N= 3 independent experiments.



**Figure 2.** Cell responses and cytotoxicity of the agrochemicals to B16F1 cells. Neutral red (NR), MTT, crystal violet (CV), 1/rhodamine-B accumulation (drug-efflux transporters activity) normalized by NR, cell migration (scratch), clonogenic, ROS levels, P53 qPCR and ABCB5 qPCR. Concentrations 3 and 5 are 10-fold lower and 10-fold higher than that calculated using the acceptable daily intake from National Sanitary Surveillance Agency for all the agrochemicals (ANVISA, Brazil) as a reference (table 1). Agrochemicals and their metabolites: atrazine (Atz) and desethylatrazine (Datz), carbaryl (Carb) and 1-naphtol (Naph), and glyphosate (Gly) and aminomethylphosphonic acid (Ampa). Mixtures: 6-Pol (Atz+Carb+Ampa+Datz+Naft), 3-Pol (Gly+Atz+Carb) and 3-Met (Ampa+Datz+Naft). N= 3 independent experiments.

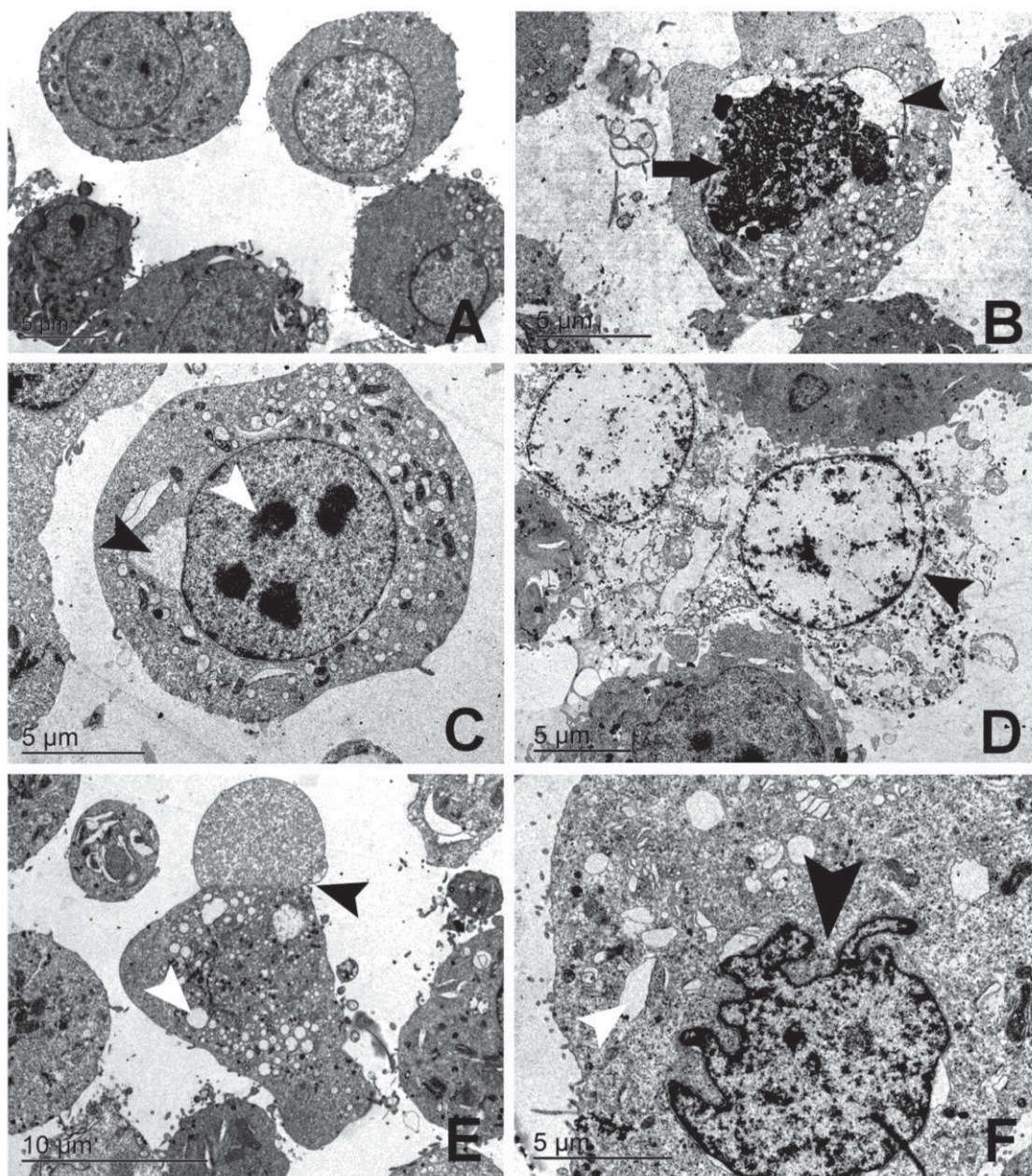
**A**





**Figure 3.** Cell cycle and death in percentage for B16F1 cells after exposure to the agrochemicals. Agrochemicals and their metabolites: atrazine (Atz) and desethylatrazine (Datz), carbaryl (Carb) and 1-naphtol (Naph), and glyphosate (Gly) and aminomethylphosphonic acid (Ampa). Mixtures: 6-Pol (Atz+Carb+Ampa+Datz+Naph), 3-Pol (Gly+Atz+Carb) and 3-Met (Ampa+Datz+Naph).  $p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  indicate differences of pesticides groups in comparison to the control group. N= 3 independent experiments.





**Figure 4.** Ultrastructural effects of agrochemicals on B16F1 cells after 24 h of exposure. A - DMSO control group. B - Cells exposed to glyphosate. Observe the severe damages on nucleus chromatin organization (arrow) and on the nuclear envelope (arrowhead). C - The effects of 1-naphtol are observed on nuclear envelope (black arrowhead) and chromatin condensation (white arrowhead). D - Cells exposed to a mixture of three original contaminants (glyphosate, atrazine and carbaryl) where a necrosis cell death is found (arrowhead). E - The exposure to three metabolites (AMPA, desethylatrazine and 1-naphtol) lead to cytoplasm vacuolization (white arrowhead) and loss of plasmatic membrane integrity. F - The nuclear alterations were found in cells exposed to a mixture of six compounds (primary molecules and metabolites) (arrowhead).

## 4. DISCUSSION

### 4.1 EXPOSURE TO AGROCHEMICALS ALTERS THE VIABILITY AND METABOLISM OF B16F1 CELLS

The set of results from cells exposed to isolated agrochemicals showed different time- and concentration-dependent effects on cell viability/number, but in general NR retention, which evaluates the integrity of endolysosomal system, increased at 24 h-exposure for the highest concentrations of the metabolites of atrazine (Datz) and carbaryl (Naph). These data is reflected by morphological effects, despite of some findings as vacuolization and nuclear alterations. Apparently these morphological damages do not interfere, at this moment, on cell physiology when exposed to both metabolites. For 48 h-exposure, cell viability/number increased for the highest concentrations of atrazine and Ampa (glyphosate metabolite), and decreased for the lowest ones. MTT metabolism, which evaluates enzymatic conversion of MTT to formazan by dehydrogenases, decreased particularly for Naph (24 and 48 h) and Ampa (24 h). Additionally, the morphological effects on cells after 24-exposure corroborate these findings since a more severe effects are observed on this group. Since NR and MTT assays evaluate different aspects of cell viability, the difference of effects may reflect the different cellular processes impaired by the agrochemicals.

Curiously, slight increase of cell viability were observed after 48 h-exposure in all agrochemical metabolites, mixtures, atrazine and carbaryl (cell death assay), except for glyphosate. The Ampa, glyphosate metabolite, reduced MTT metabolism whereas glyphosate led to severe ultrastructure effects to B16F1 cells at 24 h-exposure.

In general, decreases of cell viability (NR assay), not observed in the lone exposures, occurred for the majority of mixtures at 24 h but not at 48 h-exposure also corroborated by ultrastructure analyses. Conversely, for 6-Pol3 NR retention decreased at 48 h but not at 24 h and cell viability increased (cell death assay), indicating the maintenance of the integrity of plasma membrane (cell death assay) even at impairment of endolysosomal system or decrease of endolysosomes. These findings are initial evidence of hormesis, characterized by the biphasic dose-response relationship stimulation at low and inhibition at high doses of an effect.

According to Calabrese *et al.* (2008) a response modification with overcompensation after an initial interruption in homeostasis is a rebound effect. The ultrastructure results showed that the mixtures of the tested compounds in the present study led to a higher diversity of cellular damages. Although, only 24-exposed cells were evaluated the results from mixture exposition revealed the needs to increase this kind of approach as represent a more realistic pathway.

The different responses concerning to MTT metabolism increasing for some agrochemicals (e.g., Datz, Carb, Gly) and decreasing for others (e.g., Naft and Ampa) suggest distinct toxic potentiality and mechanisms for these compounds. For the mixtures, only the decreases of MTT metabolism were observed, which corroborates with the decrease of NR retention. These are important findings because reflect in ultrastructure effects as observed to mixture exposures. The increase of mitochondrial metabolic activity (Alamar Blue<sup>®</sup> assay) at 2 h to primary, its metabolites and mixtures of agrochemicals, probably is explained by an adaptation mechanism. If longer exposed, this increase persisted for some periods of time when cells are exposed to Ampa5 and foremost 6-Pol3.

#### 4.2 EXPOSURE TO AGROCHEMICALS NEGATIVELY AFFECTS THE NUMBER OF ATTACHED CELLS AND OF COLONIES

The number of attached cells slightly decreased for Carb, Datz, Naph and Ampa and 3-Pol and 6-Pol (at least one concentration), with only one case of increase (Ampa3). With 2% FBS, decreased number of attached were also observed for Atz and 3-Met exposures, and no increase occurred for Ampa3. These data corroborate with the decrease of G1 phase (6-Pol3 and 3-Pol3) and the increase in the G2/M phase (6-Pol3). The G2 checkpoint prevents cells with unreplicated or damaged DNA from entering M phase. Consequently, higher percentage of cells in G2/M phase may reflect persistent DNA lesions (Kastan and Bartek, 2004).

G2 checkpoint depends on the protein p53, with high activity of p53 inhibiting transition from G2 to M phase. However, cytoplasmic P53 mRNA levels were not affected even for 6-Pol3, indicating that transcription level regulation is not necessary for the retention. Lower percentage of cells was in S phase for Datz3; in principle, disruption of DNA replication origins that have not yet been initiated (Kastan and Bartek, 2004) could cause this effect.



The B16F1 ability to form new colonies decreased more than 35% for Atz3, Datz3, Carb3, Gly3, Ampa3, 6-Pol3 and 3-Pol3, which were corroborated by either decreased NR retention (Ampa3), decreased number of attached cells (Carb3) or both (6-Pol3 and 3-Pol3). However, slight increases, instead of decreases, of cell death were observed. Thus, even if the cells were viable, some had lost the proliferative capacity as a consequence of agrochemicals-induced ROS-independent damage, a response known as reproductive failure (Vandersickela *et al.*, 2011). Although cell migration could account for the formation of new colonies (Veldwijk *et al.* 2015), the agrochemicals did not affect cell migration (scratch assay) so that the reduction of the number of colonies was probably due to reproductive failure. In addition, only the metabolites Datz and Naph induced increases of ROS levels, which were not associated with decreases of cell viability endpoints (NR, MTT, VC).

#### 4.3 EXPOSURE TO AGROCHEMICALS NEGATIVELY AFFECTS THE MULTIDRUG RESISTANCE ACTIVITY.

All agrochemicals, metabolites and mixtures caused significant decreases of the activity of drug-efflux transporters, particularly, for 24 h-experiment. This increase persisted for Atz3,5 and 6-Pol3 after 48 h-exposure. This could be explained by the increased mRNA levels of ABCB5 for Naph3 and 3-met3 as a response to decreased efflux capacity of the cells. According to Gottestman and Pastan (1993), cells may respond to chemical stress increasing the efflux of the chemical, and ABCB5 can transport rhodamine out of cells (Frank *et al.* 2003). Conversely, for the other agrochemicals, other efflux transporters or post-transcriptional regulation could be involved with the reestablishment of the activity of drug-efflux transporters at 48 h.

The ABCB5 transporters are more expressed in melanoma than benign melanocytic cells, and are associated mainly with the neoplastic progression and chemoresistance. ABCB5-expressing cells have increased capacity of chemical efflux, so that cells can survive selectively when exposed to pharmacological agents (Schatton *et al.*, 2008). Wild-type and mutated P53 can differently interfere with the regulation of several ABC transporters (Chin *et al.* 1992; Nguyen *et al.* 1994; Wang, Beck, 1998). Also, about 19% of melanoma have mutated P53 (Bertolotto, 2013), and cells with mutated P53 can stimulate the MDR1 promoter (Chin *et al.* 1992) and upregulate the expression of ABC transporters (Tonigold *et al.* 2014).

An important finding is that the exposure by Naph and 3-Met3 led to steep increase of ABCB5 transporters mRNA levels (467% and 3911%, respectively) in B16F1 cells. B16F10 cells, that are more metastatic and resistant than B16F1 cells, particularly express higher ABCB5 transporters which may have some relation with cell resistance (Ehira *et al.*, 2010; Schatton *et al.*, 2008). Thus, increased ABCB5 expression could be a first step to conversion of a low metastatic and resistant (B16F10-like) cell line.

Although the relationship of exposure to these agrochemicals and carcinogenesis is controversial, studies conducted by Karrow *et al.* (2005) found that oral exposure of rats to atrazine is sufficient to alter cell-mediated immune function, and to reduce resistance to B16F10 melanoma in rats. Carbaryl, in turn, is responsible for increasing the incidence of tumors in various rat tissues after intraperitoneal administration (Shukla *et al.*, 1992) as well as oral administration (Eisenbrand *et al.* 1976). McDuffie *et al.* (2001) and Zheng *et al.* (2001) reported the relationship between exposure to carbamate and the risk of developing non-Hodgkin's lymphoma. Kachuri *et al.* (2013) observed risks of multiple myeloma incidence and exposure to carbamates. Chang *et al.* (2006) identified alterations in human SK-N-SH neuroblastoma cells by carbamates at sub lethal concentrations, which could be associated with neurotoxicity. Thongprakaisang *et al.* (2013) found that glyphosate exerts proliferative effects on hormone-dependent breast cancer, and Schinasi and Leon (2014) reported positive association between B-cell lymphoma and glyphosate in a meta-analysis of 44 papers.

There are plenty data on the association of environmental chemicals and carcinogenesis, but few data on their effects on cancer progression. Hernández *et al.* (2017) reported that it is important to advance our understanding of the hazard assessment of pesticide mixtures at realistic doses and model their cumulative effects on humans and the environment.

In a general overview the exposure to the isolated pollutants increased the viability, metabolism and proliferation. In contrast, the mixtures presented antagonistic effects for ROS levels (Datz3 and Naph3), since the combined effect of the mixture is less than that expected from the total additive effect of the individual components (Hernández *et al.* 2017). In addition, 6-Pol3 demonstrated persistent decrease of efflux transporters activity and 3-Pol3 had increased ABCB5 mRNA levels, which were not observed in the isolated compounds. Finally a diversity of

applied biomarkers, including morphological findings, revealed and corroborate the needs of investigate the role of mixtures of chemicals on cells, since this experimental design are realistic with the exposure to human population.

#### 4.4 FINAL COMMENTS

Some of the effects observed for B16F1 cells, such as increased viability/cell number (NR, MTT and cell death assays), ABCB5 mRNAs and drug efflux transporters activity, are of vital interest since some changes on cell phenotype could render melanoma cells even more unresponsive to chemotherapy. Additionally, the effects occurred at concentrations acceptable for daily intake established by Brazilian regulatory agency.

#### **Conflict of Interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### **Acknowledgements**

We thank Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco and Dr. Edvaldo da Silva Trindade for their collaboration with the project idea, and Dr. Silvio Sanches Veiga and Marcia Regina Appel by their contribution. This research was supported by CNPq (Brazilian Agency for Science and Technology) and CAPES (PhD scholarship).

#### **REFERENCES**

- ANVISA Monographic index. National Health Surveillance Agency. Accessed: September, 2017.
- Bertolotto, C., 2013. Melanoma: From Melanocyte to Genetic Alterations and Clinical Options. Scientifica 2013.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3874946/>)
- Borenfreud, E., Babich, H., Martin-Alguacil, N., 1988. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays – the Neutral Red (nr) and tetrazolium MTT tests. Toxic. In Vitro 2, 1-6. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20702351>)
- Calabrese, E.J., 2008. Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists. Toxicology and Chemistry 27, 1451–1474.  
(<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/07-541.1/full>)

Carvalho, F.P., 2006. Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environ. Sci. Policy* 9, 685-692.

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1462901106001092>)

Chang, P., Wu, Y.J., Li, W., Leng, X.F., 2006. Effect of carbamate esters on neurite outgrowth in differentiating human sk-n-sh neuroblastoma cells. *Chemico-Biological Interactions* 159, 65–72.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16256972>)

Chin, K.V., Ueda, K., Pastan, I., Gottesman, M.M., 1992. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science* 255, 459–462.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1346476>)

Cornwall, R., Toomey, B.H., Bard, S., Bacon, C., Jarman, W.M., Epel, D., 1995. Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of the mussel *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates. *Aquatic Toxicol.* 31, 277- 296. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166445X94000707>)

Dennis, L.K., Lynch, C.F., Sandler, D.P., Alavanja, M.C., 2010. Pesticide use and cutaneous melanoma in pesticide applicators in the agricultural heath study. *Environmental Health Perspectives* 118, p. 812–817.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164001>)

Ehira, N., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Kondo, T., Asaka, M., Ehira, T. S., *et al.*, 2010. An embryo-specific expressing TGF- $\beta$  family protein, growth-differentiation factor 3 (GDF3), augments progression of B16 melanoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 29, 135.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2972255/pdf/1756-9966-29-135.pdf>)

Eisenbrand, G., Schmähl, D., Preussmann, R., 1976. Carcinogenicity in Rats of High Oral Doses of N-nitroso-carbaryl, a Nitrosated Pesticide. *Cancer Lett.* 1, 281-284.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/828075>)

Fields, R.D., Lancaster, M.V., 1993. Dual attribute continuous monitoring of cell proliferation cytotoxicity. *American Biotechnology Laboratory* 11, 48-50.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7763491>)

Fletcher, J.I., Haber, M., Henderson, M., Norris, M.D., 2010. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nature Reviews. Cancer* 10, 147-56.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20075923>)

Frank, N.Y., Pendse, S.S., Lapchak, P.H., Margaryan, A., Shlain, D., Doeing, C., Sayegh, M.H., Frank, M.H., 2003. Regulation of Progenitor Cell Fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a Novel Human ATP-binding Cassette Transporter. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 47156–47165.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12960149>)

Franken, N.A.P., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., Bree, C.V., 2006. Clonogenic assay of cells In vitro. *Nature Protocols* 1, 2315 – 2319.

(<http://www.nature.com/nprot/journal/v1/n5/full/nprot.2006.339.html>)



Gammon, M.D., Santella, R.M., 2008. PAH, genetic susceptibility and breast cancer risk: An update from the Long Island breast cancer study project. *European Journal of Cancer* 44, p. 636-640.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18314326>)

Gottesman, M.M., Pastan, I., 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 385-427.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8102521>)

Hernández, A.F., Gil, F., Lacasaña, M., 2017. Toxicological interactions of pesticide mixtures: an updatate. *Archives of Toxicology*, 1 – 13.

(<https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-017-2043-5>)

IARC (International Agency for Research on Cancer).

(<http://iarc.fr/ENG/Classification/index.php>).

Kachuri, L., Demers, P.A., Blair, A., Spinelli, J.J., Pahwa, M., McLaughlin, J.R., Pahwa, P., Dosman, J. A., Harris, S.A., 2013. Multiple pesticide exposures and the risk of multiple myeloma in Canadian men. *International Journal of Cancer* 133, 1846–1858.

(<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.28191/abstract>)

Kalal, B.S., Upadhyay, D., Pai, V.R., 2017. Chemotherapy resistance mechanisms in advanced skin cancer. *Oncol. Rev.* 11, 326.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5379221/>)

Karrow, N.A., McCay, J.A., Brown, R.D., Musgrove, D.L., Guo, T.L., Germolec, D.R., White, K.L. Jr., 2005. Oral exposure to atrazine modulates cell-mediated immune function and decreases host resistance to the B16F10 tumor model in female B6C3F1 mice. *Toxicology* 209, 15–28.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15725510>)

Kastan, M.B.; Bartek, J., 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 18, 316-23.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15549093>)

Kim, J.H., Ahn, J.H., Lee, M., 2017. Upregulation of microRNA-1246 is associated with BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma Cells with Mutant BRAF. *Cancer Res Treat*

(<https://www.e-crt.org/journal/view.php?doi=10.4143/crt.2016.280>)

Kueng, W., Silber, E., Eppenberger, U., 1989. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical Biochemistry* 182, 16-19.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2604040>)

Lacina, L., Kodet, O., Dvořánková<sup>1</sup>, B., Szabo<sup>1</sup>, P., Smetana, K. Jr., 2017. Ecology of melanoma cell. *Histology and Histopathology*.

([http://www.hh.um.es/Abstracts/Vol\\_/\\_/\\_\\_11926.htm](http://www.hh.um.es/Abstracts/Vol_/_/__11926.htm))

Lee, B.; Sandhu, S.; McArthur, G., 2015. Cell cycle control as a promising target in melanoma. *Curr. Opin. Oncol.* 27, 141-50.  
(<http://journals.lww.com/sci-hub.cc/co-oncology/pages/articleviewer.aspx?year=2015&issue=03000&article=00011&type=abstract>)

Liang, C.C., Park, A.Y., Guan, J.L., 2007. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols* 2, 329-333.  
(<http://www.nature.com/nprot/journal/v2/n2/full/nprot.2007.30.html>)

Liebel, S., de Oliveira, R.C.A., de Magalhães, V.F., da Silva, R.C., Rossi, S.C., Randi, M.A., Filipak Neto, F., 2015. Low concentrations of cylindrospermopsin induce increases of reactive oxygen species levels, metabolism and proliferation in human hepatoma cells (HepG2). *Toxicol In Vitro.* 29, 479-488.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25575781>)

Machana, S., Weerapreeyakul, N., Barusrux, S., Nonpunya, A., Sripanidkulchai, B., Thitimetharoch, T., 2011. Cytotoxic and apoptotic effects of six herbal plants against the human hepatocarcinoma (HepG2) cell line. *Chinese Medicine* 6, 39.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22041055>)

MCDuffie, H.H., Pahwa, P., McLaughlin, J.R., Spinelli, J.J., Fincham, S., Dosman, J.A., Robson, D., Skinnider, L.F., Choi, N.W., 2001. Non-Hodgkin's Lymphoma and Specific Pesticide Exposures in Men : Cross-Canada Study of Pesticides and Health. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 10, 1155–1163.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11700263>)

Maru, G.B., Hudlikar, R.R., Kumar, G., Gandhi, K., Mahimkar, M.B., 2016. Understanding the molecular mechanisms of cancer prevention by dietary phytochemicals: From experimental models to clinical trials. *World J Biol Chem.* 7, 88-99.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4768127/>)

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Met.* 65, 55-63.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>)

Nguyen, K.T., Liu, B., Ueda, K., Gottesman, M.M., Pastan, I., Chin, K.V., 1994. Transactivation of the human multidrug resistance (MDR1) gene promoter by p53 mutants. *Oncol. Res.* 6, 71–77.  
(<http://www.ingentaconnect.com/contentone/cog/or/1994/00000006/00000002/art00005>)

Pessatti, M.L., Resgalla Jr., C., Reis Fo., R.W., Kuehn, J., Salomão, L.C., Fontana, J.D., 2002. Variability of rates of filtration, respiration and assimilation and multixenobiotic mechanism resistance (MXR) of mussel *Perna perna* under lead influence. *Braz. J. Biol.* 62, 651-656.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12659015>)

Pichichero, E., Cicconi, R., Mattei, M., Muzi, M.G.; Canini, A., 2010. Acacia honey and chrysin reduce proliferation of melanoma cells through alterations in cell cycle progression. *International Journal of Oncology* 37, 973-981.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20811719>)

Poskus, L.T., Lima, R.S.M.S., Lima, I.R., Guimarães, J.G.A., Silva, E.M., Granjeiro, J.M.G., 2009. Cytotoxicity of current adhesive systems: in Vitro testing on cell culture of L929 and Balb/C 3T3 fibroblasts. *Rev. Odonto Ciênc.* 24, 129-134.  
(file:///C:/Users/Yvanna/Downloads/4838-17939-1-PB.pdf)

Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L., 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3, 1125.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18600217>)

Rusyn, I., Corton, J.C., 2012. Mechanistic considerations for human relevance of cancer hazard of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* 750, 141-158.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22198209>)

Schatton, T., Murphy, G.F., Frank, N.Y., Yamaura, K., Waaga-Gasser, A.M., Gasser, M., Zhan, Q., Jordan, S., Duncan, L.M., Weishaupt, C., Fuhlbrigge, R.C., Kupper, T.S., Sayegh, M.H., Frank, M.H., 2008. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 451, 345–349.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18202660?dopt=Abstract&holding=npg>)

Schinasi, L.; Leon, M.E., 2014. Non-Hodgkin Lymphoma and Occupational Exposure to Agricultural Pesticide Chemical Groups and Active Ingredients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11, 4449–4527.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24762670>)

Shukla, Y., Antony, M., Mehrotra, N.K., 1992. Carcinogenic and cocarcinogenic studies with carbaryl following topical exposure in mice. *Cancer Lett.* 62, 133-40.  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030438359290183V>)

Siegel, R., Miller, K.D., Jemal, A., 2017. Cancer statistics. *A Cancer Journal for Clinicians* 66, 7-30. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26742998>)

Smith, M.T., Guyton, K.Z., Gibbons, C.F., Fritz, J.M., Portier, C.J., Rusyn, I., DeMarini, D.M., Caldwell, J.C., Kavlock, R.J., Lambert, P.F., Hecht, S.S., Bucher, J.R., Stewart, B.W., Baan, R.A., Coglian, V.J., Straif, K., 2016. Key Characteristics of Carcinogens as a Basis for Organizing Data on Mechanisms of Carcinogenesis. *Environ Health Perspect.* 124, 713–721.  
(<https://ehp.niehs.nih.gov/15-09912/>)

Szakacs, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Gentle, C., Gottesman, M.M., 2006. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 5, 219-34.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16518375>)

Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T., Satayavivad, J., 2013. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food and Chemical Toxicology* 59, 129–136.  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23756170>)

Tonigold, M., Rossmann, A., Meinold, M., Bette, M., Märken, M., Henkenius, K., Bretz, A.C., Giel, G., Cai, C., Rodepeter, F.R., Beneš, V., Grénman, R., Carey, T.E., Lage, H., Stiewe, T., Neubauer, A., Werner, J.A., Brendel, C., 2014. A cisplatin-resistant head and neck cancer cell line with cytoplasmic p53mut exhibits ATP-binding cassette transporter upregulation and high glutathione levels. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*  
(<http://link.springer.com.secure.sci-hub.cc/article/10.1007%2Fs00432-014-1727-y>)

Vandersickela, V., Slabbertb, J., Thierensa, H., Vra, A., 2011. Comparison of the colony formation and crystal violet cell proliferation assays to determine cellular radiosensitivity in a repair-deficient MCF10A cell line. *Radiation Measurements*, 46, 72-75.  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350448710002982>)

Veldwijk, M.R., Neumaier, C., Gerhardt, A., Giordano, F. A., Sütterlin, M., Herskind, C., Wenz, F., 2015. Comparison of the proliferative and clonogenic growth capacity of wound fluid from breast cancer patients treated with and without intraoperative radiotherapy. *TCR journal*, 4.  
(<http://tcr.amegroups.com/article/view/4233>)

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C., 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods*. 184, 39-51. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175995000721>)

Wang, Q.J., Beck, W.T., 1998. Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wildtype p53. *Cancer Res.* 58, 5762–5769.  
(<http://cancerres.aacrjournals.org/content/58/24/5762.long>)

Weber, G.J., Sepúlveda, M.S., Peterson, S.M., Lewis, S.S., Freeman, J.L., 2013. Transcriptome alterations following developmental atrazine exposure in zebrafish are associated with disruption of neuroendocrine and reproductive system function, cell cycle, and carcinogenesis. *Toxicol. Sci.* 132, 458-66.  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23358194>)

Zheng, T., Zahm, S.H., Cantor, K.P., Weisenburger, D.D., Zhang, Y., Blair, A., 2001. Agricultural Exposure to Carbamate Pesticides and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma. *Journal of Occupational & Environmental Medicine* 43, 641-649.

## 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No capítulo I demonstramos que o 2,4,6-TBF é ligeiramente citotóxico para a célula de melanoma B16F1 levando à alteração do MTT, diminuição da proliferação celular e efluxo de Rodamina-b; e, aumentando a expressão do gene ABCB5. Entretanto, outro destaque do trabalho foi o uso de concentrações realistas de 2,4,6-TBF. Poucos estudos descreveram os efeitos do 2,4,6-TBF após a exposição *in vivo* e *in vitro* e nenhum estudo utilizou concentrações reduzidas do mesmo.

De fato, de acordo com o “*Concise International Chemical Assessment Document*” a concentração de  $6 \times 10^{-2} \mu\text{m}$  de 2,4,6-TBF é aproximadamente metade daquela bioacumulada em porções de peixe comestíveis ( $39 \mu\text{g.kg}^{-1}$  ou  $0,12 \mu\text{m}$ ) e  $6 \times 10^0 \mu\text{m}$  é menor que a concentração encontrada em porções comestíveis de crustáceos ( $2360 \mu\text{g.kg}^{-1}$  ou  $7,13 \mu\text{m}$ ). Além disso, Thomsen, Lundanes, Becher (2002) relataram concentrações de 2,4,6-TBF de  $0,077\text{-}1,3 \text{ ng.g}^{-1}$  de lipídios no soro ( $\approx 1,9 \times 10^{-6} - 3 \times 10^{-5} \mu\text{m}$ , considerando o teor de lipídios de  $800 \text{ mg.dl}^{-1}$  no sangue) de homens com cerca de 40-50 anos de idade entre 1977 e 1999 na Noruega.

Com o aumento contínuo da produção industrial, e considerando que a população humana não é exposta apenas através da dieta (IUCLID, 2003; OMS, 2005); acreditamos que as concentrações de 2,4,6-TBF utilizadas no presente estudo correspondem àquelas a que os seres humanos podem facilmente estar expostos, uma vez que não existem estudos recentes sobre a biodisponibilidade do poluente em humanos. Então, os dados aqui apresentados, trazem achados relevantes sobre a toxicidade do 2,4,6-TBF e abrem muitas oportunidades a investigações relacionadas à sua toxicidade e ao risco de exposição em baixas concentrações ao mesmo.

A exposição ao 2,4,6-TBF, na concentração de  $6 \times 10^0 \mu\text{m}$ , levou ao aumento do metabolismo mitocondrial (*Alamar Blue*<sup>®</sup>) e celular (MTT), revelando uma demanda maior de energia pela célula devido à exposição, apesar de não ser identificada alteração significativa da viabilidade celular; esses achados sugerem uma resposta inicial da célula que se estende de 24 a 48 horas de exposição. O 2,4,6-TBF também levou à resposta em “*hormesis*” entre 2 h até 72 h de exposição identificada pelo ensaio do *Alamar Blue*<sup>®</sup>. Segundo Pullen; Boecker; Tiegs (2003), a ausência de citotoxicidade foi relatada quando hepatócitos de ratos (C57BL/6) foram expostos a até  $30 \mu\text{m}$  de 2,4,6-TBF; e, segundo Cantón et al . (2006) até  $10 \mu\text{m}$  em

linhagem celular de carcinoma adrenocortical humano (H295R). Em geral, baixas concentrações de 2,4,6-TBF não são tóxicas para células sob exposição a curto prazo, mas a perturbação do metabolismo mitocondrial pode representar uma questão importante para estudos posteriores. Os aumentos do metabolismo (MTT) não foram associados à proliferação celular, uma vez que a proliferação celular diminuiu a  $6 \times 10^{-1} \mu\text{m}$  (48 h) e  $6 \times 10^1 \mu\text{m}$  (24 - 48 h) em meio com 10% de soro fetal bovino (SFB), redução esta confirmada com a exposição em meio com 2% de SFB. O ensaio do ciclo celular corroborou esta descoberta, com aumento da porcentagem de células na fase G1 e diminuição na fase G2-M ( $6 \times 10^0 \mu\text{m}$ , 48 h de exposição). Vale lembrar que a indução do ponto de controle G1 é importante para o reparo do DNA e indução da apoptose; mas a integridade do DNA também é verificada na fase G2, garantindo uma duplicação precisa do genoma (LEE; SANDHU; MCARTHUR, 2015).

De acordo com Patel et al. (2013), o ensaio MTT é muito útil para distinguir entre proliferação celular e ativação, o que explica os resultados do aumento do metabolismo e redução da proliferação relatada no presente estudo. No entanto, Olsen et al. (2002) não relataram efeitos significativos na proliferação de uma linhagem de câncer de mama humano dependente de estrogênio (MCF-7) exposta à concentrações maiores (0,1 mM) de 2,4,6-TBF; diferença esta que pode ser devido às diferenças intrínsecas entre ambas linhagens.

O 2,4,6-TBF não afetou os níveis de ROS e expressão do gene P53 mRNA. P53 é um fator de transcrição que pode atrasar ou interromper a progressão do ciclo celular, induzir apoptose, senescência e limitar a proliferação celular em resposta ao estresse celular (LEE SANDHU; MCARTHUR, 2015); porém, cerca de 19% dos melanomas possuem proteína P53 mutada (BERTOLOTTI et al., 2011).

Estudos recentes indicam que os bromofenóis marinhos podem ser agentes anticancerígenos promissores, com relatos de redução da adesão celular, migração e invasão *in vitro* em várias linhagens celulares tumorais e, portanto, com importantes efeitos anti-metastáticos (WU et al., 2015; SHI et al., 2009; LIU et al., 2012); na presente pesquisa, o 2,4,6-TBF causou uma redução da capacidade de migração das células B16F1 ( $6 \times 10^0 \mu\text{m}$ ), porém, não afetou o número de células. Ressaltamos que, além desses parâmetros indicados pelos autores, é importante analisar também a quimiorresistência da célula exposta ao poluente.



O desenvolvimento de pequenos compostos sintéticos e a identificação de produtos naturais que inibem o efluxo de medicamentos mediados por transportadores ABC tem sido uma abordagem convencional usada para combater o fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (MDR) (WU; CALCAGNO; AMBUDKAR, 2008). No entanto, a Rodamina 123 e outros moduladores de transportadores ABC exibem vários efeitos que demonstram interações complexas com transportadores, e, a avaliação de compostos como inibidores ou ativadores dos transportadores depende do substrato usado para competição (MUNIC; HLEVNJAK; HABER, 2011). A atividade dos transportadores de efluxo de drogas diminuiu no ensaio de Rodamina-B ( $6 \times 10^{-2} \mu\text{M}$  às 24 h e exposição de 48 h,  $6 \times 10^0 \mu\text{M}$  à exposição de 24 h).

As células com P53 mutado podem aumentar a expressão dos transportadores ABC (TONIGOLD et al. 2014) e estimular o promotor MDR1 (Chin et al., 1992). Então, o gene MDR1 pode ser ativado durante a progressão do tumor associada a mutações p53, como já descrito anteriormente. Na verdade, vários estudos relataram que as proteínas P53 de tipo selvagem e mutadas podem desempenhar um papel na regulação de vários transportadores ABC, como ABCB1 (MDR1, P-gp) e ABCC1 (MRP1) (CHIN et al., 1992; NGUYEN et 1994, WANG; BECK, 1998).

No presente estudo, as células B16F1 expostas ao 2,4,6-TBF apresentaram níveis aumentados de transcritos de mRNA ABCB5 ( $6 \times 10^0 \mu\text{M}$ ), que podem ter alguma relação com a resistência celular, uma vez que a alta expressão de ABCB5 é uma característica das células de melanoma murino B16F10, que apresenta-se mais metastática e quimiorresistente do que as células B16F1 (EHIRA et al., 2010; SCHATTON et al., 2008). Além disso, as células podem responder ao estresse químico aumentando o efluxo do produto químico (GOTTESTMAN; PASTAN, 1993), e os aumentos tempo-dependentes aqui encontrados na expressão do gene de ABCB5 na exposição de 48 h podem ser uma resposta à diminuição da capacidade de efluxo das células.

A exposição ao 2,4,6-TBF causou aumentos significativos da retenção de Rodamina-B no experimento 24 h, sugerindo um comprometimento dos transportadores de efluxo de drogas. Para a maior concentração de 2,4,6-TBF, a retenção de Rodamina-B aumentou apenas no experimento 24 h, uma vez que houve um aumento da expressão dos transportadores ABCB5 em 48 h de



exposição; que podem transportar a Rodamina para fora das células (FRANK et al., 2003) . Esta é uma descoberta muito importante, porque Schatton et al. (2008) relataram que os melanomas primários e metastáticos expressam significativamente mais ABCB5 do que as células melanocíticas benignas, de modo que o ABCB5 pode ser associado à progressão neoplásica e à resistência à quimioterapia do melanoma maligno. De fato, as células que expressam ABCB5 sobrevivem seletivamente quando expostas a medicamentos utilizados no tratamento contra melanoma metastático, como dacarbazina, vemurafenib e vários outros.

No Capítulo II, o conjunto de resultados das células expostas a agroquímicos isolados mostrou diferentes efeitos, tempo e concentração-dependentes, na viabilidade / número de células. Porém, em geral a retenção do corante Vermelho Neutro (VN), que avalia a integridade do sistema endolisossômico, aumentou na exposição de 24 h para as maiores concentrações dos metabólitos da atrazina, a desetilatrazina (Datz), e do carbaril, o 1-Naftol (Naft); estes dados são corroborados pela avaliação dos efeitos morfológicos, como vacuolizações e alterações nucleares.

Aparentemente, esses danos morfológicos não interferem, neste momento, na fisiologia celular quando expostos a ambos os metabolitos. Para a exposição de 48 h, a viabilidade/número de células aumentou para as maiores concentrações de atrazina e Ampa (metabolito de glifosato) e diminuiu para as menores concentrações dos mesmos. O metabolismo do MTT, que avalia a conversão enzimática do MTT para o formazan pelas desidrogenases, diminuiu particularmente para Naft (24 e 48 h) e Ampa (24 h). Além disso, os efeitos morfológicos nas células após 24-exposição corroboram esses achados, uma vez que os efeitos mais graves são observados neste grupo. Visto que os ensaios VN e MTT avaliam diferentes aspectos da viabilidade celular, a diferença de efeitos pode refletir os diferentes processos celulares prejudicados pelos agroquímicos.

Curiosamente, observou-se um ligeiro aumento da viabilidade celular após 48 h de exposição em todos os metabolitos dos agroquímicos, misturas, atrazina e carbaril (teste de morte celular), com exceção do glifosato. O Ampa, reduziu o metabolismo MTT, enquanto que o glifosato conduziu a efeitos severos de ultraestrutura nas células B16F1 frente à exposição de 24 h.

Em geral, as diminuições da viabilidade celular (ensaio VN), não observadas nas exposições isoladas, ocorreram para a maioria das misturas em 24 h, mas não em 48h de exposição, também corroboradas por análises de ultraestrutura. Por outro

lado, a retenção do corante VN de 6-Pol3 diminuiu em 48 h, mas não em 24 h de exposição, ou seja, aumentou a viabilidade celular (teste de morte celular), indicando a manutenção da integridade da membrana plasmática (teste de morte celular), mesmo em deficiência do sistema endolissossômico ou diminuição dos endolissossomos. Essas descobertas são evidências iniciais de *hormesis*, caracterizada pela estimulação da relação dose-resposta bifásica em baixas concentrações e inibição de um efeito em altas concentrações. De acordo com Calabrese (2008) uma modificação de resposta com sobrecompensação após uma interrupção inicial na homeostase é um efeito de rebote.

Os resultados da ultraestrutura mostraram que as misturas dos compostos testados no presente estudo levaram a uma maior diversidade de danos celulares. Embora, mesmo que apenas as células expostas a 24 foram avaliadas, os resultados da exposição da mistura revelaram as necessidades para ampliar esse tipo de abordagem, que representam uma via mais realista dos danos biológicos.

As diferentes respostas relativas ao metabolismo MTT que aumentam para alguns agroquímicos (por exemplo, Datz, Carb, Gli) e decrescente para outros (por exemplo, Naft e Ampa) sugerem potencialidades e mecanismos tóxicos distintos para esses compostos. Para as misturas, apenas as diminuições do metabolismo MTT foram observadas, o que corrobora com a diminuição da retenção do corante VN. Estas são descobertas importantes porque refletem os efeitos da ultraestrutura observados nas exposições à mistura.

Já o aumento da atividade metabólica mitocondrial (*Alamar Blue*®) às 2 h para os compostos parentais, seus metabólitos e misturas de agroquímicos, provavelmente é explicado por um mecanismo de adaptação. Esse aumento persistiu por alguns períodos de tempo quando as células foram expostas ao Ampa5 e ao mais importante 6-Pol3.

O número de células aderidas diminuiu ligeiramente para Carb, Datz, Naft, Ampa, 3-Pol e 6-Pol (pelo menos uma concentração), com apenas um caso de aumento (Ampa3). Com SFB a 2%, o número reduzido de adesão também foi observado para exposições Atz e 3-Met, e não houve aumento na Ampa3. Esses dados corroboram com a diminuição da fase G1 (6 Pol3 e 3 Pol3) e o aumento da fase G2 / M (6 Pol3). O ponto de controle G2 evita que células com DNA não replicado ou danificado entrem na fase M. Conseqüentemente, maior porcentagem

de células na fase G2/M podem refletir lesões de DNA persistentes (KASTAN; BARTEK, 2004).

O ponto de verificação G2 depende da expressão da proteína p53, com alta atividade de p53 inibindo a transição da fase G2 para M. No entanto, os níveis de mRNA de P53 citoplasmáticos não foram afetados mesmo para 6-Pol3, indicando que a regulação do nível de transcrição não é prioritariamente essencial para a retenção. Para a exposição ao Datz3, ocorreu um menor percentual de células na fase S; em princípio, a ruptura das origens da replicação do DNA que ainda não foram iniciadas (KASTAN; BARTEK, 2004) podem causar esse efeito.

A capacidade de B16F1 de formar novas colônias reduziu em mais de 35% para Atz3, Datz3, Carb3, Gly3, Ampa3, 6-Pol3 e 3-Pol3, que foram corroborados pela diminuição da retenção de VN (Ampa3), diminuição do número de células aderidas (Carb3) ou ambos (6-Pol3 e 3-Pol3). No entanto, observaram-se tênues aumentos, ao invés de reduções, de morte celular. Assim, mesmo que as células fossem viáveis, algumas perderam a capacidade proliferativa como consequência do dano independente da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzido por agroquímicos, uma resposta conhecida como falha reprodutiva (VANDERSICKELA et al., 2011). Embora a migração celular possa explicar a formação de novas colônias (VELDWIJK et al., 2015), os agroquímicos não afetaram a migração celular (*Scrath*), de modo que a redução do número de colônias provavelmente deveu-se à falha reprodutiva. Além disso, apenas os metabolitos Datz e Naft induziram aumentos dos níveis de ROS, que não estavam associados a diminuição dos parâmetros finais de viabilidade celular (VN, MTT, CV).

Todos os agroquímicos, metabólitos e misturas causaram diminuições significativas da atividade de transportadores de efluxo de drogas, particularmente, para a exposição de 24 h. Este aumento persistiu para Atz3,5 e 6 Pol3 após 48 h de exposição. Isso poderia ser explicado pelo aumento dos níveis de mRNA de ABCB5 para Naph3 e 3-met3 como resposta à diminuição da capacidade de efluxo das células. De acordo com Gottestman e Pastan (1993), as células podem responder ao estresse químico, aumentando o efluxo do produto químico e ABCB5 pode transportar a Rodamina-B para fora das células (FRANK et al., 2003). Por outro lado, para os outros agroquímicos, outros transportadores de efluxo ou regulações pós-transcricionais poderiam estar envolvidos com o restabelecimento da atividade dos transportadores de efluxo de drogas em 48 h de exposição.

Como já citado anteriormente, os transportadores ABCB5 são mais expressos em melanoma que células melanocíticas benignas e estão associados principalmente à progressão neoplásica e quimiorresistência, sendo que as células que expressam ABCB5 têm maior capacidade de efluxo químico, de modo que as células podem sobreviver seletivamente quando expostas a agentes farmacológicos (SCHATTON et al., 2008).

Uma descoberta importante é que a exposição por Naft e 3-Met3 levou a um aumento acentuado dos níveis de mRNA dos transportadores ABCB5 (467% e 3911%, respectivamente) nas células B16F1. Assim, o aumento da expressão de ABCB5 pode ser um primeiro passo para a progressão de uma linhagem celular para um maior poder metastático e resistente (tipo B16F10).

Embora a relação de exposição a esses agroquímicos e carcinogênese seja controversa, estudos realizados por Karrow et al. (2005) descobriram que a exposição oral de ratos à atrazina é suficiente para alterar a função imune mediada por células e para reduzir a resistência ao melanoma B16F10 em ratos. O carbaril, por sua vez, é responsável por aumentar a incidência de tumores em vários tecidos de ratos após a administração intraperitoneal (SHUKLA et al., 1992), bem como a administração oral (EISENBRAND et al., 1976). McDuffie et al. (2001) e Zheng et al. (2001) relataram a relação entre a exposição ao carbamato e o risco de desenvolver linfoma não-Hodgkin. Kachuri et al. (2013) observaram riscos de incidência de mieloma múltiplo e exposição a carbamatos. Chang et al. (2006) identificaram alterações em células de neuroblastoma humano (SK-N-SH) por carbamatos em concentrações sub-letais, que podem estar associadas à neurotoxicidade. Thongprakaisang et al. (2013) descobriram que o glifosato exerceu efeitos proliferativos sobre câncer de mama dependente de hormônios e, Schinasi e Leon (2014) relataram associação positiva entre linfoma de células B e glifosato em uma meta-análise envolvendo 44 artigos.

Existem muitos dados sobre a associação de produtos químicos ambientais e carcinogênese, mas poucos dados sobre seus efeitos sobre a progressão do câncer. Hernández, Gil, Lacasaña (2017) sugerem que é importante avançar nossa compreensão da avaliação de risco de misturas de pesticidas em doses realistas e modelar seus efeitos cumulativos nos seres humanos e no meio ambiente. Em uma visão geral, a exposição aos poluentes isolados aumentou a viabilidade, metabolismo e proliferação. Em contraste, as misturas apresentaram efeitos

antagonistas para os níveis de ROS (Datz3 e Naph3), uma vez que o efeito combinado da mistura é menor do que o esperado do efeito aditivo total dos componentes individuais (HERNÁNDEZ; GIL; LACASAÑA, 2017). Além disso, a exposição a 6-Pol3 demonstrou diminuição persistente da atividade dos transportadores de efluxo de drogas e a exposição a 3-Pol3 aumentaram os níveis de mRNA de ABCB5, que não foram observados nos compostos isolados.

### **3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Uma diversidade de biomarcadores aplicados, incluindo achados morfológicos, revelou e corroborou as necessidades de investigar o papel das misturas de produtos químicos nas células, já que este desenho experimental é realista com a exposição da população humana.

Alguns dos efeitos observados para as células B16F1, como o aumento da viabilidade / número de células (VN, MTT e ensaios de morte celular), mRNA ABCB5 e atividade de transportadores de efluxo de drogas, são de interesse vital, uma vez que algumas alterações no fenótipo celular podem tornar o melanoma menos responsivos à quimioterapia. Além disso, os efeitos ocorreram em concentrações aceitáveis para a ingestão diária estabelecida pela agência reguladora brasileira. Em suma, podemos concluir que:

- A exposição ao ,4,6-TBF pode alterar as respostas celulares em concentrações muito baixas.
- O 2,4,6-TBF pode modular a quimiorresistência celular pela expressão de transportadores do subtipo ABCB5.
- As células de melanoma murino B16F1 expostas a agroquímicos isoladamente e em misturas alteram respostas celulares em concentração e tempo-dependentes, em concentrações realísticas.
- A exposição a agroquímicos altera a viabilidade e o metabolismo das células B16F1.
- A exposição aos agroquímicos afeta negativamente o número de células aderidas e de colônias; e a atividade do mecanismo de efluxo de drogas responsável pela resistência a múltiplos medicamentos.
- A exposição de agroquímicos isolada ou simultaneamente e sua interferência com o prognóstico do câncer pode estar relacionada ao sistema de transporte ABC.

Finalmente, essas descobertas são de grande importância porque os seres humanos estão em contato com uma miríade de moléculas orgânicas através da dieta, água e ar, e nenhum estudo foi realizado para investigar o papel dos agroquímicos no prognóstico do câncer.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R.; ABARKELI, R. B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two brazilian soils. **Chemosphere**, v. 52, p. 799–804, 2003.
- AMARANTE JR, O. P.; SANTOS, T. C. R. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Quim. Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.
- ARAÚJO, A. J. D. et al. Multiple exposure to pesticides and impacts on health : a cross-section study of 102 rural workers, Nova Friburgo, RJ. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 115–130, 2007.
- BARANOWSKA, I. et al. Elisa and hplc methods for atrazine and simazine determination in trophic chains samples . **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, p. 341–348, 2008.
- BASTOS, L. H. P. et al. Possíveis fontes de contaminação do alimento leite , por agroquímicos , e estudos de monitoramento de seus resíduos : uma revisão nacional monitoring their residues : a brazilian national review. **Cad. Saúde Colet.**, v. 19, n. 1, p. 51–60, 2011.
- BERTOLOTTO, C. et al. A sumoylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. **Nature**, v. 480, p. 94–98, 2011.
- BOFFETTA, P. et al. Atrazine and cancer: a review of the epidemiologic evidence. **Eur. J. Cancer. Prev.**, v. 22, n. 2, p.169-180, 2013.
- BOHM, G. M. B. et al. Resíduos de glifosato e ácido aminometilfosfônico e teores de isoflavonas em soja brs 244 rr e brs 154. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 192–197, 2008.
- BOLOGNESI, C. et al. Biomonitoring of genotoxic risk in agricultural workers from five colombian regions: association to occupational exposure to glyphosate. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, part a: Current Issues, v. 72, n. 15-16, 2009.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Diretrizes diagnósticas e terapêuticas do melanoma maligno cutâneo**, Brasília, 2013.
- CALABRESE, E. J. Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists. **Toxicology and Chemistry**, v. 27, p. 1451–1474, 2008.
- CANTÓN, R. F. et al. Inhibition and induction of aromatase (cyp19) activity by brominated flame retardants in H295R human adrenocortical carcinoma cells. **Toxicological Sciences**, v. 88, n. 2, p. 447–455, 2005.
- CANTÓN, R. F. et al. In vitro effects of brominated flame retardants and metabolites on CYP17 catalytic activity: A novel mechanism of action? **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 216, p. 274–281, 2006.



CARMO, D. A. DO et al. Environmental behavior and toxicity of herbicides atrazine and simazine. **Revista Ambiente & Agua**, v. 8, n. 1, 2013.

CARVALHO, F. P. Agriculture, pesticides, food security and food safety. **Environ. Sci. Policy**, v. 9, n. 7-8, p. 685-692, 2006.

CHANG, P. et al. Effect of carbamate esters on neurite outgrowth in differentiating human SK-N-SH neuroblastoma cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 159, p. 65–72, 2006.

CHIN, K.V. et al. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. **Science**, v. 255, p. 459–462, 1992.

CLEMONS, M.; GOSS, P. Estrogen and the risk of breast cancer. **The New England Journal of Medicine**. v. 344, n. 4, 2001.

COOPER, R. L. et al. Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. **Toxicological Sciences**, v. 53, p. 297–307, 2000.

DENNIS, L. K. et al. Pesticide use and cutaneous melanoma in pesticide applicators in the agricultural health study. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 6, p. 812–817, 2010.

DEVILLERS, J.; BINTEIN, S. DOMINE, D. Comparison of bcf models based on log p. **Chemosphere**, v. 33, p. 1047 - 1065, 1996.

DORES, E. F. G.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Aquatic environment contamination by pesticides. case study: water used for human consumption in primavera do leste, mato grosso - preliminary analyses. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 27-36, 2001.

EHIRA, N. et al., 2010. An embryo-specific expressing TGF- $\beta$  family protein, growth-differentiation factor 3 (GDF3), augments progression of B16 melanoma. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 29, p. 135, 2010.

EISENBRAND, G; SCHMÄHL, D; PREUSSMANN, R. Carcinogenicity in rats of high oral doses of N-nitroso-carbaryl, a nitrosated pesticide. **Cancer Lett.**, v. 1, n. 5, p. 281-284, 1976.

FLETCHER, J. I. et al. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, p. 147-56, 2010.

FRANK, N. Y. et al. Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 47156–47165, 2003.

FRANZ, J. E. Discovery, development and chemistry of glyphosate. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). **The Herbicide Glyphosate**. London: Butterworths & Co. Ltda., p. 3-17, 1985.

FREEMAN, J. L.; BECCUE, N.; RAYBURN, A. L. Differential metamorphosis alters the endocrine response in anuran larvae exposed to T<sub>3</sub> and atrazine. **Aquatic Toxicology**, v. 75, p. 263–276, 2005.

GALLI, A. et al. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Quim Nova**, v. 29, n. 1, p. 105–112, 2006.

GAMMON, M. D.; SANTELLA, R. M. PAH, genetic susceptibility and breast cancer risk: An update from the Long Island breast cancer study project. **European Journal of Cancer**, v. 44, n. 5, p. 636-640, 2008.

GARBELLINI, G. S.; ULIANA, C. V. Toxidez , degradação no meio ambiente e métodos eletroanalíticos de detecção do pesticida carbaril. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 17, p. 29–36, 2007.

GARCÍA, M. Á.; SANTAEUFEMIA, M.; MELGAR, M. J. Triazine residues in raw milk and infant formulas from Spanish northwest , by a diphasic dialysis extraction. **Food and Chemical toxicology**, v. 50, p. 503–510, 2012.

GEORGE, J. et al. Studies on glyphosate-induced carcinogenicity in mouse skin : A proteomic approach. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 5, p. 951–964, 2010.

GOTTESMAN, M.M.; PASTAN, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. **Annu. Rev. Biochem.**, v.62, p.385-427, 1993.

GUTIÉRREZ, M. et al. Occupational and environmental exposure to tribromophenol used for wood surface protection in sawmills. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 15, n. 3, p.171-179, 2005.

HERNÁNDEZ, A. F.; GIL, F.; LACASAÑA, M. Toxicological interactions of pesticide mixtures: an updatate. **Archives of Toxicology**, v. 2017, p. 1 – 13, 2017.

HOLLOWAY, A. C. et al. Atrazine-induced changes in aromatase activity in estrogen sensitive target tissues. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, p. 260–270, 2008.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Disponível em: <http://iarc.fr/ENG/Classification/index.php>, Acessado em: 2013.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Incidência de Câncer no Brasil**. 2012. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/> Acesso em: nov/2016.

INOUE, M. H. et al. Criteria for evaluation of the leaching potential of herbicides used in paraná. **Planta Daninha**, v. 21, n. 2, p. 313-323, 2003.

JOWA, L.; HOWD, R. Should atrazine and related chlorotriazines be considered carcinogenic for human health risk assessment? **J. Environ. Sci. Health C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.**, v. 29, n. 2, p. 91-144, 2011.

KACHURI, L. et al. Multiple pesticide exposures and the risk of multiple myeloma in Canadian men. **International Journal of Cancer**, v. 133, p. 1846–1858, 2013.

KALAL, B. S.; UPADHYA, D.; PAI, V. R.. Chemotherapy resistance mechanisms in advanced skin cancer. **Oncol. Rev.**, v. 11, p. 326, 2017.

KARROW, N. A. et al. Oral exposure to atrazine modulates cell-mediated immune function and decreases host resistance to the B16F10 tumor model in female B6C3F1 mice. **Toxicology**, v. 209, p. 15–28, 2005.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer Michael B. Kastan1 & Jiri Bartek. **Nature**, v. 432, 2004.

KIM, H. et al. Erythema multiforme major due to occupational exposure to the herbicides alachlor and butachlor. **Emergency Medicine Australasia**, v. 23, p. 103–105, 2011.

KING, G. M. Inhibition of microbial activity in marine sediments by a bromophenol from a hemichordate. **Nature**, v. 323, p. 257-259, 1986.

KOLLER, V. J. et al. Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. **Arch. Toxicol.**, v. 86, p. 805–813, 2012.

LARINI, L. **Toxicologia dos Praguicidas**. São Paulo: Manole, 230 p, 1999.

LACINA, L. et al. Ecology of melanoma cell. **Histology and Histopathology**, 2017.

LASSERRE, J. P. et al. Effects of the endocrine disruptors atrazine and PCB 153 on the protein expression of MCF-7 human cells. **Journal of Proteome Research**, v. 08, n. 12, p. 5485-5496, 2009

LEE, B.; SANDHU, S.; MCARTHUR, G. Cell cycle control as a promising target in melanoma. **Curr. Opin. Oncol.**, v. 27, p. 141-50, 2015.

LI, Q et al. Glyphosate and AMPA inhibit cancer cell growth through inhibiting intracellular glycine synthesis. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 7, p. 635–643, 2013.

LIU, M. et al. Marine bromophenol bis(2,3-dibromo-4,5-dihydroxybenzyl) ether, induces mitochondrial apoptosis in K562 cells and inhibits topoisomerase I in vitro. **Toxicol. Lett.**, v. 211, p. 126-34, 2012.

MARTÍNEZ, A.; REYES, I.; REYES, N. Citotoxicidad del glifosato en células mononucleares de sangre periférica humana. **Biomédica**, v. 50, p. 594–604, 2007.

MARU, G. B. et al. Understanding the molecular mechanisms of cancer prevention by dietary phytochemicals: From experimental models to clinical trials. **World J Biol Chem.**, v. 7, p. 88-99, 2016.

MCDUFFIE, H. H. et al. Non-Hodgkin's lymphoma and specific pesticide exposures in men: cross-Canada Study of pesticides and health. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 10, p. 1155–1163, 2001.

MCELROY, J. A. et al. Risk of breast cancer for women living in rural areas from adult exposure to atrazine from well water in Wisconsin. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 17, p. 207–214, 2007.

MENDES, R. **Patologia do trabalho**. Rio de Janeiro: Atheneu, 643 p, 1997.

MINK, P. J. et al. Epidemiologic studies of glyphosate and cancer: A review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 63, n. 3, p. 440–452, 2012.

MUNIC, V.; HLEVNJAK, M.; HABER, V. E. Characterization of rhodamine-123, calcein and 5(6)-carboxy-20, 70-dichlorofluorescein (CDCF) export via MRP2 (ABCC2) in MES-SA and A549 cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, p. 359–369, 2011.

NGUYEN, K.T. et al. Transactivation of the human multidrug resistance (MDR1) gene promoter by p53 mutants. **Oncol. Res.**, v. 6, p. 71–77, 1994.

OLSEN, C. M. et al. Brominated phenols: characterization of estrogen-like activity in the human breast cancer cell-line MCF-7. **Toxicology Letters**, v. 129, p. 55–63, 2002.

PASSOS, F.; REIS, M. R. Resíduos de agroquímicos em alimentos de origem vegetal: revisão. Pesticidas: R. **Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 23, p. 49–58, 2013.

PATEL, H. D. et al. Comparison of the mtt and alamar blue assay for in vitro anti cancer activity by testing of various chalcone and thiosemicarbazone derivatives. **Int J Pharm Bio Sci.**, v. 4, n. 2, p. 707 - 716, 2013.

PEDERSÉN, M.; SAENGER, P.; FRIES, L. Simple brominated phenols in red algae. **Phytochemistry**, v. 13, p. 2273-2279, 1974.

PULLEN, S.; BOECKER, R.; TIEGS, G. The flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrabromobisphenol A/bisallylether suppress the induction of interleukin-2 receptor  $\alpha$  chain (CD25) in murine splenocytes. **Toxicology**, v. 184, p. 11-22, 2003.

QUEIROZ, B. P. V.; MONTEIRO, R. T. R. Degradação de 14 c-atrazina em solo sob condições semicontroladas. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 35, n. 4, p. 849–856, 2000.

RAMPOLDI, A.; HANG, S.; BARRIUSO, E. Glyphosate mineralization: effect of temperature and soybean and corn crop residues. **Chilenan Journal of Agricultural Research**, v. 68, n. 1, p. 13–20, 2008.

ROSS, A. J. de et al. Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 60, n. 09, p. 01 – 09, 2003.

ROOS, A. J. de et al. Cancer incidence among glyphosate-exposed pesticide applicators in the agricultural health study. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 1, p. 49–54, 2005.

RUSYN, I.; CORTON, J. C. Mechanistic considerations for human relevance of cancer hazard of di(2-ethylhexyl) phthalate. **Mutation Research-Reviews in Mutation Research**, v. 750, n. 2, p.141-158, 2012.

SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nature Reviews Cancer**, 2016.

SCHATTON, T. et al. Identification of cells initiating human melanomas. **Nature**, v. 451, p. 345–349, 2008.

Shi, D. et al. The antitumor effect of bromophenol derivatives in vitro and *Leathesia nana* extract in vivo. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 27, p. 277–282, 2009.

SCHINASI, L.; LEON, M. E. Non-Hodgkin lymphoma and occupational exposure to agricultural pesticide chemical groups and active ingredients : a systematic review and meta-analysis. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 11, p. 4449–4527, 2014.

SHUKLA, Y.; ANTONY, M.; MEHROTRA, N. K. Carcinogenic and cocarcinogenic studies with carbaryl following topical exposure in mice. **Cancer Lett.**, v. 62, n. 2, p.133-40, 1992.

SIEGEL, R.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, p. 7-30, 2016.

SILVA, J. M. et al. Agrotóxico e trabalho : uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, n, 4, 2005.

SIMPKINS, J. W. et al. Atrazine and breast cancer : a framework assessment of the toxicological and epidemiological evidence. **Toxicological Sciences**, v. 123, n. 2, p. 441–459, 2011.

SMITH, M. T. et al. Key characteristics of carcinogens as a basis for organizing data on mechanisms of carcinogenesis. **Environ Health Perspect.**, v. 124, p. 713–721, 2016.

SZAKACS, G. et al. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 5, p. 219-34, 2006.

TAKAKURA, N. et al. In vitro combined cytotoxic effects os pesticide cocktails simultaneously found in the french diet. **Food Chem. Toxicol.**, v. 52, p. 153-162, 2013.

THOMSEN, C.; LUNDANES, E.; BECHER, G. Brominated flame retardants in archived serum samples from Norway: a study on temporal trends and the role of age. **Environ. Sci. Technol.**, v. 36, p. 1414-1418, 2002.

THONGPRAKASANG, S. et al. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 129–136, 2013.

TONGZHANG, Z. et al. Agricultural exposure to carbamate pesticides and risk of non-Hodgkin lymphoma. **Journal of Occupational & Environmental Medicine**, v. 43, n. 7, p. 641-649, 2001.

TONIGOLD, M. et al. A cisplatin-resistant head and neck cancer cell line with cytoplasmic P53mut exhibits ATP-binding cassette transporter upregulation and high glutathione levels. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 140, n. 10, p. 1689-704, 2014.

VANDERSICKELA, V. et al. Comparison of the colony formation and crystal violet cell proliferation assays to determine cellular radiosensitivity in a repair-deficient MCF10A cell line. **Radiation Measurements**, v. 46, p. 72-75, 2011.

VELDWIJK, M. R. et al. Comparison of the proliferative and clonogenic growth capacity of wound fluid from breast cancer patients treated with and without intraoperative radiotherapy. **TCR journal**, v. 4, 2015.

VIBERG, H.; FREDRIKSSON, S.; ERIKSSON, P. Neonatal exposure to polybrominated diphenyl ether (PBDE 153) disrupts spontaneous behaviour, impairs learning and memory, and decreases hippocampal cholinergic receptors in adult mice. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 192, n. 2, p. 95-106, 2003.

YAMADA, T.; TAKAHAMA, Y.; YAMADA, Y. Biodegradation of 2,4,6-Tribromophenol by *Ochrobactrum* sp. strain TB01. **Biosc. Biotechnol. Biochem.**, v. 72, n. 5, p. 1264–1271, 2008.

WANG, Q. J.; BECK, W. T. Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wildtype P53. **Cancer Res.**, v. 58, p. 5762–5769, 1998.

WEBER, G. J. et al. Transcriptome alterations following developmental atrazine exposure in zebrafish are associated with disruption of neuroendocrine and reproductive system function, cell cycle, and carcinogenesis. **Toxicol. Sci.**, v. 132, n. 2, p. 458-66, 2013.

WHO. International Health Regulations. World Health Organization, 2 ed., 2005. Disponível em: [http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/cicad\\_66\\_web\\_version.pdf?ua=1](http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/cicad_66_web_version.pdf?ua=1). Acesso em: set/2017.

WU, C. P.; CALCAGNO, A. M.; AMBUDKAR, S. V. Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: evaluation of current strategies. **Curr. Mol. Pharmacol.**, v. 1, p. 93–105, 2008.